

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie Tübingen
Abteilung für Molekularpharmakologie
Abteilungsleiter: Professor Dr. U. Quast

Der Einfluss der porenbildenden Untereinheit des K_{ATP} -
Kanals auf die pharmakologischen Eigenschaften des
Sulfonylharnstoffrezeptors SUR2B(Y1206S)

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Felix Wolff
aus
München

2009

Dekan:

Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichtstatter:

Professor Dr. U. Quast

2. Berichtstatter:

Professor Dr. F. Lang

für Jürgen Wolff

INHALTSVERZEICHNIS

1 EINLEITUNG	1
1.1 Ionenkanäle	1
1.1.1 Kaliumkanäle	1
1.1.1.1 Spannungsabhängige Kaliumkanäle (K_V)	3
1.1.1.2 Ca^{2+} -aktivierte Kaliumkanäle (K_{Ca})	4
1.1.1.3 Einwärtsgleichrichtende Kaliumkanäle (K_{IR})	4
1.1.1.4 Tandem-Kaliumkanäle (K_{2P})	5
1.2 ATP empfindliche Kaliumkanäle (K_{ATP})	6
1.2.1 Die porenbildende α -Untereinheit $K_{IR}6.x$ der K_{ATP} -Kanäle	8
1.2.1.1 Aufbau von $K_{IR}6.x$	9
1.2.2 Die β -Untereinheit SUR (Sulfonylharnstoffrezeptor) der K_{ATP} -Kanäle	10
1.2.2.1 Aufbau des SUR	11
1.2.3 Zusammensetzung und Expression der K_{ATP} -Kanäle	14
1.2.4 Physiologische Rolle der K_{ATP} -Kanäle	15
1.2.4.1 $K_{IR}6.2/SUR1$	16
1.2.4.2 $K_{IR}6.1/SUR2B$	17
1.2.4.3 $K_{IR}6.2/SUR2A$	17
1.2.5 Regulation der K_{ATP} -Kanäle	18
1.2.5.1 Nukleotide	18
1.2.5.2 Lipide	20
1.2.5.3 Phosphorylierung	21
1.3 Pharmakologische Eigenschaften der K_{ATP}-Kanäle	22
1.3.1 K_{ATP} -Kanal-Inhibitoren	22
1.3.2 K_{ATP} -Kanal-Öffner	27
1.4 Kardiovaskuläres Risiko der Therapie mit K_{ATP}-Kanal-Inhibitoren	29
1.5 Fragestellung	32
2 MATERIAL UND METHODEN	34
2.1 Geräte und Hilfsmittel	34
2.2 Reagenzien/Chemikalien	35

2.3 Puffer	36
2.3.1 Puffer zur Herstellung der Geneticin-Stammlösung	36
2.3.2 Isotoner Puffer zur Präparation von HEK293-Zellmembranen	36
2.3.3 Inkubationspuffer für Radioligandbindungsstudien an HEK293- Zellen	36
2.3.4 Waschpuffer zum Auswaschen nicht gebundener Radioaktivität und zum Inkubationsstopp	37
2.4 Synthetische K_{ATP}-Kanalmodulatoren	37
2.5 DNA-Plasmide	38
2.6 Medien/Stammlösungen	39
2.6.1 Kulturmedium für HEK293-Zellen	39
2.6.2 Inkubationsmedium für HEK293-Zellen	40
2.6.3 Gefriermedium zur Kryokonservierung von HEK293-Zellen	40
2.6.4 Stammlösungen für die Proteinbestimmung nach Lowry	40
2.7 HEK293-Zellen	41
2.7.1 Kultivierung von HEK293-Zellen	42
2.7.2 Transfektion von HEK293-Zellen mit Lipofectamin™2000	43
2.7.3 Auftauen von HEK293-Zellen	45
2.7.4 Einfrieren von HEK293-Zellen	45
2.8 Proteinbestimmung nach Lowry	46
2.9 Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien	48
2.9.1 Konkurrenzexperiment	49
2.9.2 Radioligandenwahl	50
2.9.2.1 ^3H -GBC	51
2.9.3 Durchführung der Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien	52
2.9.3.1 Gewinnung von Rezeptormaterial	53
2.9.3.2 Inkubation	53
2.9.3.3 Trennung von freiem und gebundenem Radioliganden	54
2.9.3.4 Messung der Radioaktivität	54
2.10 Modell und Voraussetzung der Rezeptorbindungsstudien	57
2.10.1 Modell des Konkurrenzexperimentes	58
2.10.2 Verallgemeinerung der Bindungsisotherme nach Hill	61

2.10.3 Datenauswertung und Statistik	62
2.10.3.1 Analyse der Bindungskurven	62
2.10.3.2 Statistik	62
3 ERGEBNISSE	64
3.1 Affinitätsbestimmung von ausgewählten Sulfonylharnstoffen und Gliniden an SUR2B(Y1206S) und K_{IR}6.1/SUR2B(Y1206S)	65
3.1.1 Bindung von langkettigen Sulfonylharnstoffen (Liganden vom Typ A+B) an SUR2B(Y1206S) und K _{IR} 6.1/SUR2B(Y1206S)	65
3.1.1.1 Homologe Verdrängung von ³ H-GBC durch GBC	65
3.1.2 Bindung von Liganden vom Typ A an SUR2B(Y1206S) und K _{IR} 6.1/SUR2B(Y1206S)	68
3.1.2.1 Heterologe Verdrängung von ³ H-GBC durch Glibornurid	68
3.1.2.2 Heterologe Verdrängung von ³ H-GBC durch Nateglinid	70
3.1.3 Bindung von Liganden vom Typ B an SUR2B(Y1206S) und K _{IR} 6.1/SUR2B(Y1206S)	72
3.1.3.1 Heterologe Verdrängung von ³ H-GBC durch Repaglinid	72
3.1.3.2 Heterologe Verdrängung von ³ H-GBC durch Meglitinid	74
3.1.3.3 Heterologe Verdrängung von ³ H-GBC durch UL-DF 9	76
3.1.3.4 Heterologe Verdrängung von ³ H-GBC durch (-)-AZ-DF 265 ..	78
3.2 Bindung von Sulfonylharnstoffen und Gliniden an SUR2B(Y1206S) und K_{IR}6.2/SUR2B(Y1206S)	80
3.2.1 Bindung von langkettigen Sulfonylharnstoffen (Liganden vom Typ A+B) an SUR2B(Y1206S) und K _{IR} 6.2/SUR2B(Y1206S)	80
3.2.1.1 Homologe Verdrängung von ³ H-GBC durch GBC	80
3.2.2 Bindung von Liganden vom Typ B an SUR2B(Y1206S) und K _{IR} 6.2/SUR2B(Y1206S)	82
3.2.2.1 Heterologe Verdrängung von ³ H-GBC durch Repaglinid	82
4 DISKUSSION	84
4.1 Effekte der Koexpression von SUR2B(Y1206S) mit K_{IR}6.1	86

4.2 Unterschiede in der Bindung von Sulfonylharnstoffen und Gliniden an die K_{ATP}-Kanal-subtypen und deren Bedeutung für unerwünschte kardiovaskuläre Arznei-mittelwirkungen	89
4.3 Effekte der Koexpression von SUR2B(Y1206S) und Selektivität von Glibenclamid und Repaglinid in bezug auf die K_{ATP}-Kanalmutante $K_{IR}6.2/SUR2B(Y1206S)$ - ein Ausblick	95
5 ZUSAMMENFASSUNG	97
6 LITERATURVERZEICHNIS	99
7 VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN	118
8 DANKSAGUNG	122
9 LEBENSLAUF	123

1 EINLEITUNG

1.1 Ionenkanäle

Ionenkanäle befinden sich in der Zellmembran und bilden dort ein System für den Transport von geladenen Teilchen. Sie bestehen aus Proteinen, die in der Lipiddoppelschicht der Zellmembran eingelagert sind, sogenannte integrale Membranproteine, und ermöglichen den Austausch von Anionen und Kationen (z.B. Cl^- , Na^+ , K^+ und Ca^{2+}) über die Zellgrenzen hinweg.

Aufgebaut sind diese Membranproteine häufig aus mehreren Untereinheiten, die die Kanaleigenschaften beeinflussen und für die Funktionalität des Kanals wichtig sind. Die Selektivität eines Kanals wird über die Offenheitswahrscheinlichkeit für ein Ion gesteuert und ist von der Leitfähigkeit des Kanals und dem elektrochemischen Gradienten abhängig. Der dabei entstehende Ionenfluss wird von dem zwischen dem Zytosol und dem Extrazellularraum befindlichen elektrochemischen Gradienten erzeugt.

Die Hauptfunktion der Ionenkanäle besteht in der Herstellung und Aufrechterhaltung des Membranpotentials, der Steuerung von zellulären Prozessen und der Erregung von Zellen.

Unterschieden werden die Ionenkanäle nach dem Aktivierungsmechanismus in ligandengesteuerte („ligand-gated“) Ionenkanäle (z.B. G-Proteine, Nukleotide), die sich öffnen, wenn der Rezeptor mit einem Agonisten besetzt ist, spannungsabhängige („voltage-gated“) Ionenkanäle, deren Offenwahrscheinlichkeit sich nach dem Membranpotential richtet, mechanisch kontrollierte Kanäle und Ionenkanäle, die sich durch De-/Phosphorylierung regeln lassen.

1.1.1 Kaliumkanäle

Kaliumkanäle sind eine in der Natur weit verbreitete Gruppe von Kanälen (> 70 verschiedene Kanaltypen), die v.a. eine stabilisierende Funktion für Zellen hat. Aufgabe der Kaliumkanäle ist es das Membranpotential nahe dem Gleichgewichtspotential von Kalium (-98 mV bei 37°C) zu halten.

Eine Beeinflussung der Kaliumkanäle kann über Transmitter oder Hormone, Membranpotentialänderungen und den metabolischen Zustand der Zelle erfolgen (81). Pharmakologisch können Kaliumkanäle in vielerlei Hinsicht moduliert werden. Beschrieben wurden bei Inhibitoren bestimmter Kaliumkanäle z.B. insulinsekretorische Wirkungen durch Sulfonylharnstoffe oder Glinide (s. 1.3.1) und bei Kaliumkanalöffnern antiischämische, antihypertensive, antiarrhythmische und antiinkontinente Wirkungen (122;99;69;110;154).

Kaliumkanäle werden entweder als Tetramer oder als Dimer gebildet, wobei der porenbildende Anteil aus α -Untereinheiten und ein ggf. regulatorischer Anteil aus β -Untereinheiten (z.B. Sulfonylharnstoffrezeptoren in K_{ATP}) besteht (109). Charakteristisch für Kaliumkanäle ist eine sogenannte P-Schleife („loop“, H5-Schleife), die direkt an der Porenbildung der Kanäle beteiligt ist (80;79). In ihr findet sich eine allen gemeinsame Aminosäuresequenz „TXXTXGYGD“ als Signatur. Für die Kaliumselektivität in dieser P-Schleife konnte Hille (2001) die Sequenz „TXGYG“ (bzw. bei K_{ATP} „TXGFG“, s. 1.2) identifizieren (81). Eine funktionsfähige Kanalpore für Kaliumionen wird von mindestens vier P-Schleifen gebildet und daher werden Homo- bzw. Heterotetramere oder Dimere (in Tandem-Kaliumkanälen pro Untereinheit 2 P-Schleifen) geformt.

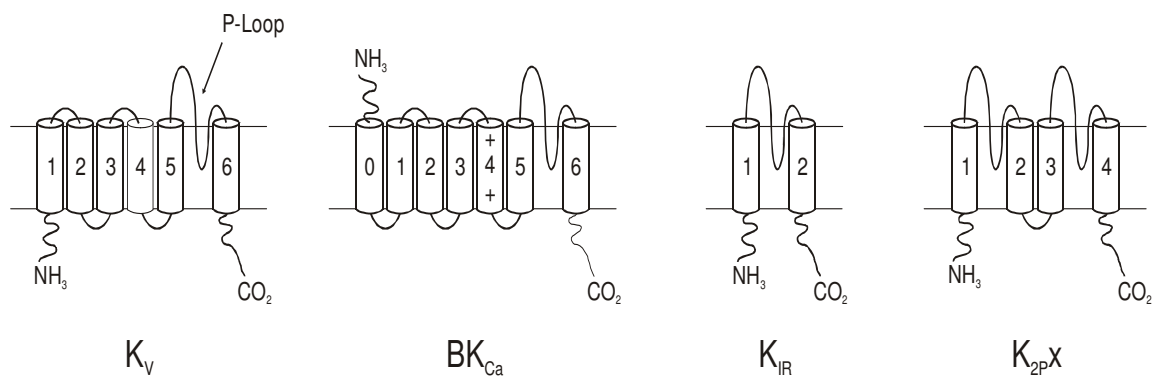


Abb. 1 Schematische Darstellung des Aufbaus der verschiedenen Kaliumkanalklassen, K_v : spannungsabhängige Kaliumkanäle; BK_{Ca} : Ca^{2+} -aktivierte Kaliumkanäle mit hoher Leitfähigkeit; K_{IR} : einwärtsgerichtete Kaliumkanäle; K_{2pX} : Tandem-Kaliumkanäle

Es können aufgrund der Struktur der α -Untereinheiten die unten genannten vier verschiedene Klassen von Kaliumkanälen unterschieden werden (s. Abb. 1) (170;70):

- 1) spannungsabhängige Kaliumkanäle (K_V)
- 2) Ca^{2+} -aktivierte Kaliumkanäle (K_{Ca})
- 3) einwärtsgleichrichtende Kaliumkanäle (K_{IR})
- 4) Tandem-Kaliumkanäle (K_{2P})

1.1.1.1 Spannungsabhängige Kaliumkanäle (K_V)

Die spannungsabhängigen Kaliumkanäle (K_V) stellen die größte Untergruppe der Kaliumkanäle dar und kommen in den meisten Zellen, v.a. in erregbaren Geweben wie Neuronen oder Myozyten, vor.

Charakteristisch für K_V ist der erleichterte Ionenfluss aus der Zelle heraus, auch verzögerte Auswärtsgleichrichtung genannt. Eine Unterscheidung kann in schnelle und langsame verzögerte Gleichrichter vorgenommen werden (81). Gleichrichter finden sich in Motoneuronen, Skelettmuskeln, Kardiomyozyten und myelinfreien Axonen. Aufgabe der K_V ist es, die Repolarisation der Zellen durch Kalium-ausstrom zu gewährleisten. Sie sind somit für die kurze Dauer der Aktionspotentiale verantwortlich (81).

Die Kaliumkanalpore wird aus einem Tetramer von jeweils 6 α -Transmembranuntereinheiten (TM), in denen die P-Schleife zwischen der TM5 und TM6 positioniert ist (vgl. 1.1.1), gebildet. Jeder K_V -Kanaltyp besitzt eine spezifische Schwellenspannung, die bei Überschreitung durch eine Depolarisation zur Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit des Kanals führt. Die Empfindlichkeit auf eine bestimmte Spannung (Spannungssensor) wird durch die TM4 vermittelt, welche eine hohe Dichte von positiv geladenen Aminosäuren aufweist.

1.1.1.2 Ca²⁺-aktivierte Kaliumkanäle (K_{Ca})

Eine Aktivierung von Kaliumkanälen über Ca²⁺-Ionen kann in vielen Zellen gefunden werden. Ihre Funktion besteht vor allem darin, nach einer Hyperpolarisation die Repolarisation einzuleiten und aufrechtzuerhalten.

K_{Ca} können in drei verschiedene Gruppen nach ihrer Leitfähigkeit eingeteilt werden: hohe (100-250 pS, BigK_{Ca} (BK_{Ca})), mittlere (20-80 pS, IntermediateK_{Ca} (IK_{Ca})) und niedrige Leitfähigkeit (4-20 pS, SmallK_{Ca} (SK_{Ca})) (81). Auch in der Struktur der K_{Ca} finden sich Unterschiede, da die BK_{Ca} aus 7 α -Transmembranuntereinheiten mit regulatorischen β -Untereinheiten und die IK_{Ca} bzw. SK_{Ca} 6 α -Transmembranuntereinheiten aufgebaut sind.

Auf Funktionsebene findet sich bei den BK_{Ca} neben der Calciumregulation eine ausgeprägte Spannungsabhängigkeit (108). BK_{Ca} sind wichtig bei der Kontrolle der Aktionspotentialdauer und -frequenz, indem sie im Zusammenspiel mit spannungsabhängigen Kaliumkanälen die Repolarisation der Zellen bewirken und zur Entstehung von schnellen hyperpolarisierenden Nachpotenzialen beitragen (191). Als regulierende Kanäle sind sie im kardiovaskulären und neuronalen System (23;174;173), sowie im Bereich des Immunsystems (4) zu finden.

Im Gegensatz zu den BK_{Ca} spielen die SK_{Ca} eine Rolle bei der Entstehung von langsamen Nachhyperpolarisationen (81). Die Calciumbindung wird über Calmodulin vermittelt, da Calcium nicht direkt an die 6TM binden kann (176).

1.1.1.3 Einwärtsgleichrichtende Kaliumkanäle (K_{IR})

Einwärtsgleichrichtende Kaliumkanäle („inwardly rectifying K⁺ channels“, K_{IR}) sind Kanäle, die den Kaliumionenfluss von extrazellulär (außen) nach intrazellulär (innen) begünstigen. Dabei kann die Gleichrichtung eines Kanals als Abweichung einer linearen Strom-Spannungskurve entweder nach außen (Auswärtsgleichrichtung) oder wie in diesem Fall nach innen (Einwärtsgleichrichtung) beschrieben werden.

Physiologisch hat der K_{IR} eine wichtige Aufgabe bei der Stabilisierung des Ruhemembranpotentials und bei den Erregungsabläufen der Zelle. Da das

Ruhemembranpotential (-30 bis -80 mV) meist nahe, aber nicht über dem Kaliumgleichgewichtspotential (ca. -90 mV) liegt, findet kaum ein Kaliumstrom in die Zelle statt. Der Name „einwärtsgleichrichtender“ Kaliumkanal führt daher ein wenig in die Irre, denn oberhalb des Kaliumgleichgewichtspotentials kommt es zu einem signifikanten Ausstrom von Kaliumionen. Dieser hilft das Membrangeleichgewicht zu stabilisieren (81).

Der K_{IR} besteht aus nur zwei α -Transmembranuntereinheiten und kann als „funktionelles Fragment“ des spannungsabhängigen Kaliumkanals betrachtet werden (105), der jedoch keinen „Spannungssensor“ besitzt (146). Die Poren werden bei dieser Kanalart aus einem Tetramer von K_{IR} -Untereinheiten aufgebaut, die die charakteristischen P-Schleifen mit Kaliumselektivität enthalten (s.1.1.1).

Die einwärtsgleichrichtenden Kaliumkanäle werden bisher in 7 Untergruppen eingeteilt ($K_{IR}1-7$). Dabei werden nach der Gleichrichtungsstärke starke ($K_{IR}2-4$) und schwache ($K_{IR}1, K_{IR}6-7$) K^+ -Einwärtsgleichrichter unterschieden (81). Bei starken „Einwärtsgleichrichtern“ kann durch eine Depolarisation über -70 mV ein Kaliumausstrom nach extrazellulär nicht mehr nachgewiesen werden. Positiv geladene Substanzen wie Mg^{2+} oder Polyamine (z.B. Spermidin) bewirken dann einen mechanischen Verschluss und damit die Inaktivierung der K_{IR} (54). Vor allem im Herzmuskel bei langen Depolarisationszeiten kann durch diesen Mechanismus ein Kaliumverlust verhindert und die Herzaktion ökonomisiert und optimiert werden (81).

Die Regulation der K_{IR} ist sehr unterschiedlich, z.B. über PIP_2 (alle K_{IR}) (117;199) oder über die $(\beta\gamma)_i$ -Untereinheit von G_i/G_k ($K_{IR}3.x$ in den Schrittmacherzellen des Myokards) (209).

1.1.1.4 Tandem-Kaliumkanäle (K_{2P})

Tandem-Kaliumkanäle (K_{2P} , „two P-region-containing outwardly rectifying K^+ -channel“) scheinen für die Aufrechterhaltung des Membranpotentials von immenser Bedeutung zu sein. Durch ihren kontinuierlichen, spannungsunabhängigen, schwach auswärtsgleichrichtenden Kaliumstrom tragen sie dazu

bei, das Potential der Zelle nahe dem Kaliumgleichgewichtspotentials zu halten (81). Bisher wurden 8 K_{2P5} (KCNK 1-8) bei Säugetieren gefunden, die über pH-Wert-Veränderungen, mechanische Beeinflussung und intrazelluläre Second messenger gesteuert bzw. moduliert werden (81;28).

Tandemkanäle bilden Poren aus 4 bzw. 8 α -Transmembranuntereinheiten und enthalten -wie der Name bereits sagt- jeweils zwei P-Schleifen.

1.2 ATP empfindliche Kaliumkanäle (K_{ATP})

In dieser Arbeit stehen die ATP empfindlichen Kaliumkanäle (K_{ATP}) im Mittelpunkt der Untersuchungen. Die ersten Entdeckungen eines ATP-sensitiven Kanals, der zur Gruppe der K_{IR6} gehört, gehen auf das Jahr 1983 zurück und wurden in Herzmuskelzellen gemacht (150). Danach folgten Entdeckungen und Beschreibungen dieser Kanäle in vielen verschiedenen Geweben: in β -Zellen des Pankreas (45;8), im Skelettmuskel (186), im Gehirn (10), in der Niere (153), in Mitochondrien (88), in glatten Muskelzellen (19), etc.

Der Kanalaufbau der K_{ATP} -Kanäle entspricht einem Heterooktamer, der aus zwei verschiedenen Untereinheiten besteht (s. Abb. 2). Es liegt eine 4:4 Stöchiometrie der α - und β -Untereinheiten vor. Die porenbildende α -Untereinheit wird von schwachen einwärtsgleichrichtenden Kaliumkanälen ($K_{IR6.x}$, x steht hier für einen von zwei möglichen Subtypen: $K_{IR6.1}/K_{IR6.2}$) gebildet. Die sich um die Poren anlagernden vier β -Untereinheiten sind regulatorische Sulfonylharnstoffrezeptoren (SURs), die zur ABC-Proteinfamilie gehören (3;85;169;41). Auch von den SURs gibt es zwei Subtypen (SUR1, SUR2). Durch alternatives Spleißen im Bereich des SUR2-Gens entstehen die physiologisch wichtigen Isoformen SUR2A (86) und SUR2B (90).

Die relative Molekülmasse der K_{ATP} -Kanäle liegt bei 950 kDa (41). Die Proteinstruktur wurde zuerst von Mikhailov et al. (2005) beschrieben und zeigte eine große Kompaktheit des Proteins mit einer Höhe von ~13 nm und einem Durchmesser von ~18 nm (130).

Die zytosolischen und transmembranären Anteile von K_{IR} und SUR befinden sich

nach diesem 3-D-Modell in sehr enger räumlicher Nähe, wie schon vorher durch K_{IR} /SUR-Interaktionsstudien vermutet worden war (60;131;11;33;27;159).

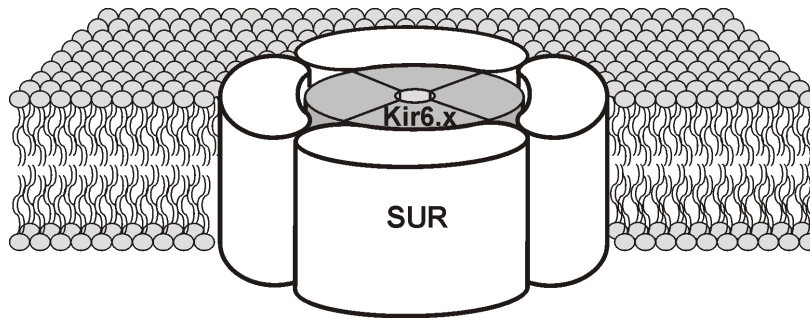


Abb. 2 Schematischer Aufbau eines K_{ATP} -Kanals in der Plasmamembran (Kir6.x, einwärtsgerichteter Kaliumkanal; SUR, Sulfonylharnstoffrezeptor)

Im Endoplasmatischen Reticulum (ER) läuft die Synthese und Reifung der K_{ATP} -Kanäle ab. Dort werden sie als Untereinheiten synthetisiert, gefaltet und initial glykosyliert. Im Kanalbildungsprozess werden die Kanaluntereinheiten zum kompletten Kanal zusammengesetzt, „unfertige“ bzw. instabile Untereinheiten und Kanäle werden wieder abgebaut, und in den Golgi-Apparat zur Proteinmodifizierung geschleust. Mit einer weiteren Glykosylierung und dem Anhängen von Salizylsäureresten endet die Reifung und der Transit des fertigen Kanals an die Plasmamembran kann erfolgen (46).

Der Einbau der Kanalkomplexe in die Zytoplasmamembran beginnt am ER und wird durch das ER-Retentionsmotiv „RKR“ geregelt. Es findet sich auf dem C-Terminus der K_{IR} 6-Sequenz sowie auf der zytoplasmatischen Schleife (zwischen TM11 und NBF1) der SUR-Sequenz und es wird verhindert, dass unvollständige Kanalkomplexe eingebaut werden (211). Tucker et al. (1997) konnten bei C-terminal verkürzten K_{IR} 6.2 ($\Delta C36/\Delta C26$, Entfernung der 36/26 C-terminalen Aminosäuren) die Bildung von funktionsfähigen Kanälen in Abwesenheit der regulatorischen Untereinheit (SUR) nachweisen (200), woraus zu schließen war, dass der „inkomplette“ Kanal über kein Retentionsmotiv mehr verfügte. Ein weiterer bedeutender Faktor beim Transport der K_{ATP} -Kanäle in die

Zytoplasmamembran wird der korrekt glykosylierten SUR-Untereinheit zugeschrieben (44). Mutationen (z.B. Deletionen, Punktmutationen) und daraus folgende Erkrankungen (z.B. persistierende hyperinsulinämische Hypoglykämie) haben Hinweise dahingehend geliefert, dass die Expression der „inkompletten“ Kanäle an der Zytoplasmamembran inhibiert wird (182;31). Crane & Aguilar-Bryan formulierten die These einer schnellen Bildung eines Heterodimerkomplexes von $K_{IR}6.2/SUR1$ mit nachfolgender langsamer Heterooktamerbildung (46). Von unserer Arbeitsgruppe in Tübingen wurde ein Modell der Komplexierung zu einem Tetramer bei SUR2B in Abwesenheit von $K_{IR}6.x$ postuliert (116). Der Abbau von K_{IR} kann durch eine Komplexbildung mit SUR1 (stabiler Zustand) verlangsamt werden (46).

Elektrophysiologisch wird die elektrische Aktivität eines K_{ATP} -Kanals durch „Burst“ (Ausbruchs)-Phasen und „Interburst“-Phasen (Ruheintervalle) beschrieben. Der Kanal wechselt oder „flackert“ in den „Burst“-Phasen hochfrequent zwischen geschlossenen und offenen Zuständen („Gaps“) (2). Die Dauer der Aktivitäts-/Inaktivitätsphasen (Offenwahrscheinlichkeit) der Kanäle wird durch Kanalmodulatoren (z.B. ATP, MgADP, s. 1.2.5) oder K_{ATP} -Inhibitoren/-Öffner beeinflusst (s. 1.3).

1.2.1 Die porenbildende α -Untereinheit $K_{IR}6.x$ der K_{ATP} -Kanäle

$K_{IR}6.x$ wird bei Menschen in zwei Varianten gebildet: den Subtypen $K_{IR}6.1$ und $K_{IR}6.2$. Die genetische Übereinstimmung (Homologie) der beiden Subtypen liegt bei 70% (87).

Humaner $K_{IR}6.1$ wird ubiquitär auf allen Zellen außer den β -Zellen des Pankreas exprimiert (180). Des Weiteren lassen elektronenmikroskopische Untersuchungen das Vorkommen von $K_{IR}6.1$ in der inneren Mitochondrienmembran vermuten (193). Das Gen von $K_{IR}6.1$ (*KCNJ8*) wurde auf Chromosom 12 an Position 12p11.23 lokalisiert und enthält drei Exons. Es hat eine Länge von 9,7 kb und eine Molekülmasse von ca. 38 kDa. Das vollständige Protein besteht aus 424 Aminosäuren und stimmt mit dem murinen $K_{IR}6.1$ in 98% überein.

Humaner $K_{IR}6.2$, auch BIR („ β -cell inward rectifier“) genannt, wird in hoher

Ausprägung im Pankreas (192) und etwas weniger stark im Herzen, in Skelettmuskelzellen, im Gehirn und in der Blase exprimiert (180). Die Lokalisation des $K_{IR}6.2$ -Gens (*KCNJ11*) ist auf dem Chromosom 11 an Position 11p 15.1. Die Länge des resultierenden Proteins beträgt 4,5 kb und es besteht aus 390 Aminosäuren, die Molekülmasse beträgt 43,5 kDa.

Die Leitfähigkeit der beiden Subtypen unterscheidet sich deutlich. Bei $K_{IR}6.1$ -Kanälen liegt sie bei ca. 30 pS (157) und ist damit deutlich geringer als die der $K_{IR}6.2$ -Kanäle (ca. 80 pS) (181). Sowohl $K_{IR}6.1$ als auch $K_{IR}6.2$ können mit allen SUR-Unterformen funktionelle Kanäle bilden.

1.2.1.1 Aufbau von $K_{IR}6.x$

Die Pore des K_{ATP} -Kanals wird von der $K_{IR}6.x$ -Untereinheit in Form eines Tetramers gebildet. Jede α -Untereinheit besitzt zwei Transmembranhelices (M1 und M2), die durch eine P-Schleife (H5-Domäne) untereinander verbunden sind (s. Abb. 3). Bisher liegt jedoch keine hochaufgelöste Struktur des $K_{IR}6.x$ vor und die erste niedrig aufgelöste Struktur, von Mikhailov et al. entdeckt (130), deutet darauf hin, ältere postulierte Modelle des Kanals zu bestätigen (149;106;5;151). Die Öffnung der Pore soll danach von den M2-Helices des Tetramers in Form eines Trichters ausgekleidet werden (vgl. Abb. 4).

Normalerweise findet sich bei K^+ -Kanälen in der P-Schleife hoch konserviert die für die Kaliumselektivität entscheidende Sequenz „GYG“ (Glycin-Tyrosin-Glycin, s.1.1.1), doch bei $K_{IR}6.x$ fand sich die veränderte Aminosäuresequenz „GFG“ (Glycin-Phenylalanin-Glycin) (180). Entscheidend für die K^+ -Selektivität soll die räumliche Anordnung der P-Schleifen der einzelnen Untereinheiten zueinander sein (30). Im oberen Drittel des durch die Membran gehenden Teils der Pore liegt eine Verengung, der Selektivitätsfilter, vor. Es wird davon ausgegangen, dass minimale schnelle Bewegungen der M2-Helices für das rasche Öffnen und Schließen der Kanalpore innerhalb eines „Bursts“ („fast gate“) ursächlich sind (118).

Stabilisiert wird Tetramerstruktur bzw. die Pore des $K_{IR}6.x$ -Kanals durch multiple Wechselwirkungen der zytosolischen Bereiche der α -Untereinheiten und es

kommt zur Ausbildung von unterschiedlichen Bindungsstellen für regulatorische Liganden wie z.B. ATP (s. 1.2.4) (198;93;5).

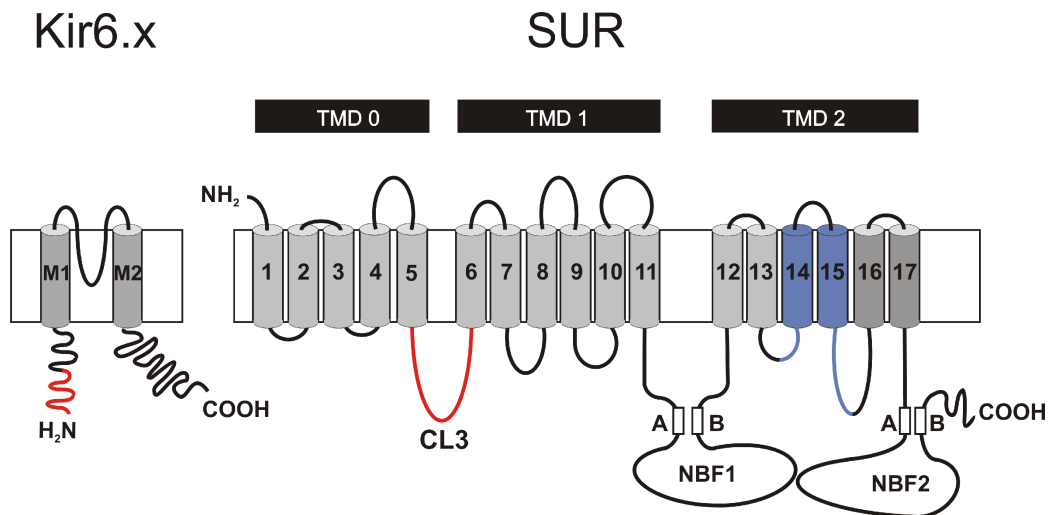


Abb. 3 Struktur eines K_{ATP}-Kanals mit funktionell wichtigen Bereichen und dem Modell der zwei Bindungstaschen (rot Bindungstasche B, blau Bindungstasche A, vgl. 1.3.1) nach Winkler et al. (2007) (208), (Kir: einwärtsgerichteter Kaliumkanal; SUR: Sulfonylharnstoffrezeptor; TMD: Transmembrandomäne; 1-17: Transmembranhelices des SUR (TM); NBF1/2: Nukleotidbindungsfalten; A,B: Walker A- und B-Motiv; M1,2: Transmembranhelices des Kir)

1.2.2 Die β -Untereinheit SUR (Sulfonylharnstoffrezeptor) der K_{ATP}-Kanäle

Neben den zwei Subtypen von K_{IR}6.x gibt es auch zwei SUR-Subtypen: SUR1 und SUR2 (86;90). Die Homologie der Sequenzen beträgt 67% (90). Kodiert werden die Proteinuntereinheiten durch zwei verschiedene Gene. *ABCC8* (SUR1) ist auf Chromosom 11 (11p 15.1) und *ABCC9* (SUR2) auf Chromosom 12 (12p 12.1) lokalisiert (40).

Die β -Untereinheit SUR2 kann durch alternatives Spleißen in zwei Varianten, SUR2A und SUR2B, ausgebildet werden, die sich nur in den letzten 42 C-terminalen Aminosäuren unterscheiden (86;90). Bei Betrachtung der entsprechenden Region des C-Terminus hat SUR2B dabei eine größere Sequenzhomologie zu SUR1 (74%) als zu SUR2A (33%) (90).

Im Vergleich zu $K_{IR}6.x$ sind die SUR-Untereinheiten deutlich größer und schwerer. SUR1 besteht aus 39 Exons, die für 1581 Aminosäuren kodieren und SUR2 besitzt 38 Exons für 1549 Aminosäuren. Die SUR-Untereinheiten haben eine relative Molekülmasse von ca. 176 kDa (26).

Die Aufgabe der Sulfonylharnstoffrezeptoren besteht in der Regulation von K_{ATP} -Kanälen. Hierfür besitzen sie Bindungsstellen für Nukleotide, K_{ATP} -Kanal-Inhibitoren und K_{ATP} -Kanal-Öffner. Die Aktivität der K_{ATP} -Kanäle kann zusätzlich durch Lipide, Phosphorylierung und den pH beeinflusst werden (s.1.2.5).

1.2.2.1 Aufbau des SUR

Sulfonylharnstoffrezeptoren gehören zur Unterfamilie ABCC der ABC-Proteine („ATP Binding Cassette“), denen allen mehrere Transmembrandomänen (TMD) und eine Nukleotidbindungsfalte (NBF) gemein sind.

Aus insgesamt 17 Transmembranhelices (TM) wird die molekulare Struktur der SURs aufgebaut, wobei sich die TM in drei Gruppen als Transmembrandomänen (TMD) mit 5 und zweimal 6 TM arrangieren (s. Abb. 3). Die erste TMD (TMD0) mit den TM 1-5 liegt am extrazellulären N-terminalen Ende des SUR und ist über eine zytosolische Schleife (CL3 = „cytosolic loop 3“ oder L0 = „cytoplasmatic loop“), bestehend aus 100 Aminosäuren, mit der TMD1 verbunden. In dieser TMD1 (TM 6-11) findet sich die erste intrazelluläre Nukleotidbindungsfalte (NBF1) und die TMD2 (TM 12-17) schließt sich direkt daran an. Die zweite NBF (NBF2) liegt ebenfalls intrazellulär und ist zwischen der TMD2 und dem C-terminalen Ende des SUR gelegen (201). Für die TMD0 wird eine räumliche Lokalisation direkt neben der M1-Transmembranhelix von $K_{IR}6.x$ postuliert (11;33;130). Babenko et al. (2003) beschrieben aus dieser Erkenntnis heraus nicht nur die Verankerung von SUR an der $K_{IR}6.2$ -Pore durch TMD0, sondern auch die funktionelle Beeinflussung der Porenfunktion durch die Wechselwirkung von TMD0 mit dem N-Terminus von $K_{IR}6.2$ (12).

Wie andere ABC-Proteine enthalten SURs zwei große intrazelluläre Schleifen („Loops“), in denen sich die NBFs befinden. Charakteristischerweise beinhalten NBFs Walker-A-Motive, die durch die Aminosäuresequenz „GXXGXGKS/T“

(X=beliebige Aminosäure) gekennzeichnet sind, und Walker-B-Motive, die durch „YYYYD“ (Y=hydrophobe Aminosäure) gekennzeichnet sind (207). Außerdem finden sich in NBFs das ABC-Signaturmotiv „LSGGQ“, auch „Linkersequenz“ genannt, und ein sogenannter „Q-Loop“ und „H-Loop“, die von den invarianten Aminosäuren Glutamin und Histidin charakterisiert werden (125).

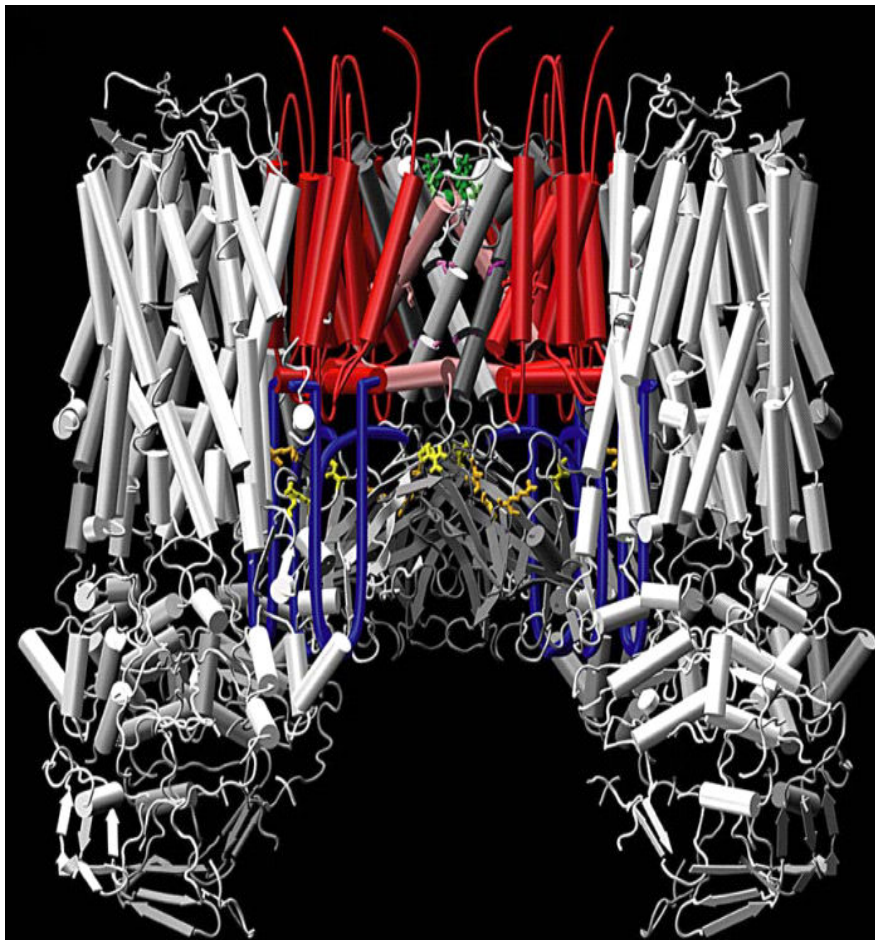


Abb. 4 Strukturmodell eines Kardiomyozyten $K_{IR}6.2/SUR2A$ rekonstruiert aus MsbA und $K_{IR}Bac1.1$ freundlicherweise von Babenko zur Verfügung gestellt (das Modell wurde in JMCC 2005 veröffentlicht)

Eine zur weiteren genaueren Beschreibung der ABC-Proteine notwendige hochaufgelöste Quartärstruktur liegt bis jetzt nicht vor und somit basieren die Modelle auf Strukturhomologien von bakteriellen Proteinen, ABC-Transporter

BtuCD oder MsbA (115;163), oder auf niedrig aufgelösten eukaryoten Strukturen von z.B. CFTR („cystic fibrosis transmembrane conductance regulator“) (164). Schwierigkeiten der Strukturanalyse werden vor allem dadurch verursacht, dass SUR-Untereinheiten mit den $K_{IR}6.x$ -Untereinheiten einen Oktamer bilden. Erstmals wurde die Struktur der K_{ATP} -Kanäle 2003 von Babenko & Bryan aus dem Strukturvergleich von MsbA (34) und $K_{IR}Bac1.1$ (106) in Annäherung modelliert (s. Abb. 4) (12). In der Folge gelang es Mikhailov et al. (2005) wie schon erwähnt die erste niedrig aufgelöste 3D-Struktur (18 Å) eines $K_{IR}6.2/SUR1$ -Kanals darzustellen (130). Daraus ließ sich die Komplexität des Kanalaufbaus und ein Abgleich mit den bereits postulierten Modellen durchführen.

Die Modelle deuten darauf hin, dass jede Hälfte von SUR in drei Schichten aufgeteilt werden kann: erstens die TMD als lipidumhüllte transmembrane Domäne, zweitens eine submembrane intrazelluläre Kopplungsdomäne, die über helikale Ausziehungen der TM mit drittens einer zytoplasmatischen NBF verbunden sind (s. Abb. 3). Die NBF kann weiter in zwei Domänen unterteilt werden. Eine α -Helix-reiche Domäne zur Erkennung des γ -Phosphates des ATPs, die mit der intrazellulären Kopplungsdomäne verbunden ist, und eine zytosolische β -Faltblattstruktur-reiche Domäne, die die Walker-A- und Walker-B-Motive enthält (84;98;95). Die Aufgabe des Walker-A-Motivs besteht in der Bindung der Nukleotidphosphate durch einen so genannten „P-Loop“. Das Walker-B-Motiv erkennt das Mg^{2+} -Ion und bringt es in Position.

Eine Bindung von ATP an SUR, genauer gesagt des γ -Phosphates an den „P-Loop“, bewirkt funktionell eine Konformationsänderung des Proteins. Hierbei nähern sich der „P-Loop“ und andere „Loops“ sowie das Walker-A-Motiv dem Signaturmotiv des gegenüberliegenden NBF an. Dort bildet sich ein Dimer aus zwei NBFs, die zwei ATP-Moleküle an ihren kommunizierenden Seiten binden und einschließen, aus (185;139;95). Äußerst wichtig scheint in diesem Zusammenhang die Aminosäure Glutamin im „Q-Loop“ (Q774(757) und Q1426(1394) in der NBF1 und NBF2 von SUR1(2)) zu sein, die als konservierte Struktur die γ -Phosphat-Bindungsstelle und das Signaturmotiv räumlich zusammenbringt. In ähnlichen ABC-Transportern konnte diese Konformitätsänderung bereits nachgewiesen werden (210;94;34;204;165). Dort dient diese

jedoch als Auslöser eines Substrattransportes, wohingegen bei SUR eine Kontrolle der Porenöffnung des Kanals als wahrscheinlich angenommen werden kann. Auch Matsuo et al. (2005) schrieben verschiedenen Loops („Q-Loop“ und „H-Loop“) im Bereich der NBFs eine funktionelle Rolle bei der Übermittlung der Nukleotidbindung zur Kanalaktivierung zu (125).

Normalerweise üben ABC-Proteine eine Transporterfunktion aus, die über Bindung und Hydrolysen von Nukleotiden (z.B. ATP) als Transport-ATPasen wirken (z.B. MRP = „multidrug resistance-associated protein“) (201). Durch diese Transport-ATPasen werden verschiedenste Komponenten von Ionen bis zu großen Polypeptiden über die Membrangrenzen transportiert. Zu den Ausnahmen dieser ABC-Superfamilie gehören z.B. SUR und CFTR, bei denen bisher keine Transportfunktion bekannt ist und die über regulatorische Eigenschaften verfügen (58).

1.2.3 Zusammensetzung und Expression der K_{ATP} -Kanäle

In Organen und Geweben von Säugetieren finden sich verschiedene Zusammensetzungen und eine unterschiedlich hohe Expressivität der einzelnen Untereinheiten von $K_{IR}6.x$ und SUR (SUR1, SUR2A und SUR2B).

Eine hohes Vorkommen von $K_{IR}6.1$ zeigt sich bei hoher Expression v.a. im Herz-, Nebennieren- und Ovarialgewebe. In Leber-, Nieren-, Dünndarm- und Hypophysengewebe kann $K_{IR}6.1$ nur gering nachgewiesen werden und in den Geweben von Lunge, Skelettmuskel, Pankreas, Magen, Dickdarm, Gehirn, Schilddrüse und Hoden wird von einem moderaten Vorkommen gesprochen (85). Inagaki et al. (1996) beschrieben für $K_{IR}6.2$ eine hohe Dichte in Pankreasinzell-, Herz-, Lungen-, Skelettmuskel-, Leber-, Magen- und Gehirngewebe (86). Eine schwache Gewebeexpression wurde von dieser Arbeitsgruppe in Schilddrüse, Niere, Nebenniere, Dick-/Dünndarm, Hoden, Nebenhoden (121) und Ovarien gefunden (86).

SUR1 wird stark im Gehirn bzw. Neuronen, sowie in den β -Zellen des Pankreas exprimiert (3). Eine hohe Expression von SUR2A fand sich in Herz- und Skelettmuskelgewebe. Ein hohes Vorkommen von SUR2B war in fast allen

Organen ubiquitär präsent, so dass sein Vorkommen in der glatten Muskulatur/Gefäßmuskulatur vermutet wird (86;90;40;38).

Die in vivo wichtigsten natürlichen Kanalkombinationen sind in Tabelle 1 ersichtlich:

Tab. 1 K_{ATP} -Kanalkombinationen in vivo

Kanalkombination des K_{ATP} -Kanal	Gewebevorkommen	Referenz
$K_{IR6.1}/SUR2B$	glatte Gefäßmuskulatur	Yamada et al., 1997
$K_{IR6.2}/SUR1$	Pankreas, Neurone	Inagaki et al., 1995 Gibble et al., 1997
$K_{IR6.2}/SUR2A$	Herz-, Skelettmuskel	Inagaki et al., 1996 Okuyama et al., 1998
$K_{IR6.2}/SUR2B$	glatte Muskulatur	Isomoto et al., 1996

Funktionsfähige K_{ATP} -Kanäle können jedoch beliebig aus allen $K_{IR6.x}$ - und SUR-Subtypen rekombinant in vitro erzeugt werden.

1.2.4 Physiologische Rolle der K_{ATP} -Kanäle

Die Aufgabe der K_{ATP} -Kanäle besteht darin, das Membranpotential an den metabolischen Zustand der Zellen zu koppeln. Dies wird über den ATP/ADP-Quotienten und den Lipidstoffwechsel geregelt (s. 1.2.5.1, 1.2.5.2).

Die einzelnen K_{ATP} -Kanal-Subtypen sind in ihrer Reaktion auf endogene oder exogene (z.B. pharmakologische) Einflüsse sehr verschieden und besitzen unterschiedliche elektrophysiologische Eigenschaften. Daher finden sich in den verschiedenen Geweben bei differierender Expression der Rezeptoren (s. 1.2.3) unterschiedliche Aufgaben der K_{ATP} -Kanäle. Zur Erforschung der Kanäle wurden Untersuchungen an verschiedenen Geweben, an genetisch modifizierten Mäusen und Trägern von K_{ATP} -Kanalmutationen durchgeführt (181).

1.2.4.1 $K_{IR}6.2/SUR1$

Der am besten untersuchte K_{ATP} -Kanal ist $K_{IR}6.2/SUR1$, der in den β -Zellen der Langerhans'schen Inseln im Pankreas stark exprimiert wird und dort die Insulinsekretion reguliert (181). Auch in übergeordneten Zentren des Energiestoffwechsels und der Energieregulation im Hypothalamus spielen K_{ATP} -Kanäle mit der Ausprägung $K_{IR}6.2/SUR1$ eine wichtige Rolle wie z.B. bei der Freisetzung von Glukagon (133).

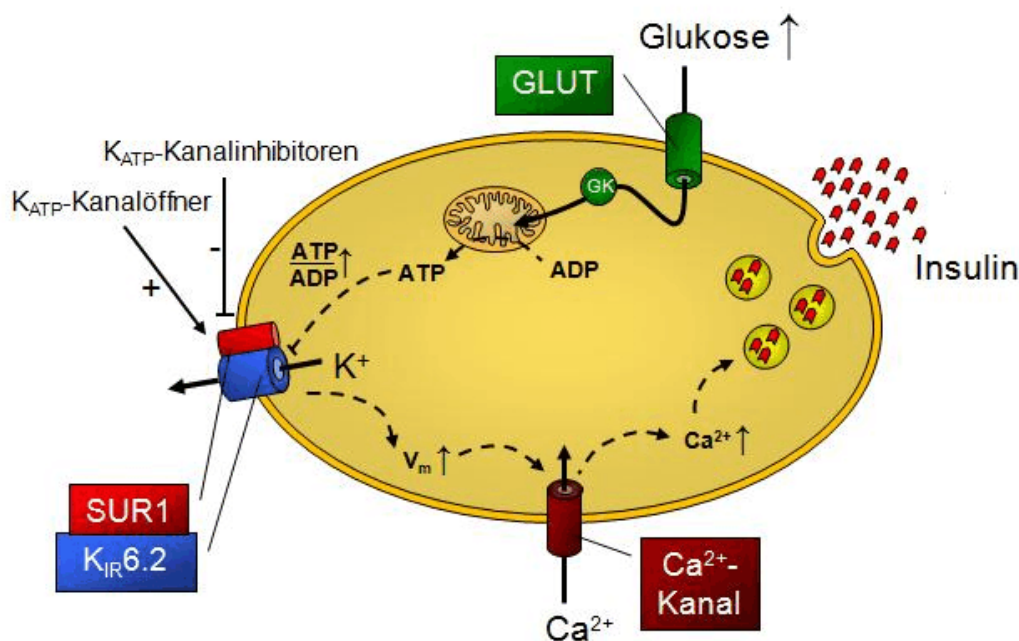


Abb. 5 Modell der physiologischen Funktionsweise von K_{ATP} -Kanälen am Beispiel der Insulinfreisetzung aus β -Zellen des Pankreas (nach Cook und Hales (1984) (45)). Bei steigender Plasmaglukose wird über den Glukosetransporter (GLUT) Glukose nach intrazellulär transportiert. Dort gelangt sie über die Glukokinase (GK) nach Glykolyse als Pyruvat in die Mitochondrien und wird aus ADP zu ATP verstoffwechselt. ATP blockiert, wenn der ATP/ADP-Quotient steigt, direkt $K_{IR}6.2$ und bewirkt den Verschluss der K_{ATP} -Kanalpore. Der Kaliumausstrom (K^+) sinkt, die Zellmembran (V_m) depolarisiert und es öffnen sich spannungsabhängige Calciumkanäle. Es resultiert ein steigende intrazelluläre Calciumkonzentration (Ca^{2+}), die ein Verschmelzen der Insulingranula mit der Plasmamembran und eine Insulinausschüttung bewirkt. K_{ATP} -Kanäle können über K_{ATP} -Kanalöffner/-inhibitoren an SUR beeinflusst werden.

Nachfolgend wird die Funktion für diesen Kanal im Pankreas exemplarisch erklärt (s. Abb. 5). In den β -Zellen des Pankreas funktioniert $K_{IR}6.2/SUR1$ als Glukosesensor, indem das Membranpotential der Zelle über den ATP/ADP-Quotienten kontrolliert wird. Eine Stabilisierung des Ruhemembranpotentials wird bei einer niedrigen Konzentration von intrazellulärem ATP, einer Plasmakonzentration der Glukose kleiner 3 mM entsprechend, gefunden. Die $K_{IR}6.2/SUR1$ -Kanäle befinden sich in einem offenen Zustand und das Ruhepotential der Zelle von -70 mV wird stabilisiert. Wird nun die Plasmaschwelle der Glukose von 3 mM überschritten und vermehrt Glukose über den Glukosetransporter GLUT (GLUT-2 in β -Zellen des Pankreas) in die Zelle aufgenommen, verstoffwechseln die β -Zellen des Pankreas die Glukose zu ATP. Der intrazelluläre ATP/ADP-Quotient steigt an und konsekutiv werden die K_{ATP} -Kanäle geschlossen bzw. die Leitfähigkeit für K^+ gesenkt. Es resultiert die Depolarisation der Zelle, woraufhin sich spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle vom L-Typ öffnen, so dass Ca^{2+} nach intrazellulär einströmt. Mit steigender Ca^{2+} -Konzentration wird letztendlich Insulin durch Exozytose ausgeschüttet.

1.2.4.2 $K_{IR}6.1/SUR2B$

Der in dieser Arbeit untersuchte Rezeptor SUR2B nimmt in Kombination mit $K_{IR}6.1$ Anteil an der Blutdruckregulation, da $K_{IR}6.1/SUR2B$ in der glatten Gefäßmuskulatur vorkommt (55;144). Im besonderen wurde dies an den Koronarien erforscht, wo $K_{IR}6.1/SUR2B$ die Dilatation der Gefäßwand fördert und es dadurch zu einer Mobilisation der Koronarreserve kommt (134;39;57). Das Funktionsprinzip besteht darin, dass geöffnete $K_{IR}6.1/SUR2B$ -Kanäle durch Hyperpolarisation der sarkolemmalen Gefäßmuskelzellenmembranen eine Vasodilatation hervorrufen (155).

1.2.4.3 $K_{IR}6.2/SUR2A$

Im Myokard, wo eine hohe Dichte von $K_{IR}6.2/SUR2A$ exprimiert wird, postulierten Murry et al. (1986) als erste das Phänomen der ischämischen Präkonditionierung

der Myozyten ((142) vgl. (67;43)). Der genaue Mechanismus ist noch nicht in allen Einzelheiten geklärt, als Auslöser bzw. Einflussgrößen werden Adenosin, Bradykinin, NO, Opioide, Norepinephrin und andere diskutiert. In physiologischen Zustand bei hohen ATP-Spiegeln sind die K_{ATP} -Kanäle geschlossen (145). Bei Sauerstoffmangel (Hypoxie) und damit niedrigem intrazellulären ATP/ADP-Verhältnis (61) und erhöhten Lipidkonzentrationen (114) werden Kardiomyozyten durch Öffnen der K_{ATP} -Kanäle hyperpolarisiert. Die Zellerregbarkeit verringert sich dadurch und es kommt zu einer verkürzten Aktionspotentialdauer. Die Dauer des Ca^{2+} -Einstroms nimmt ab und die Kardiomyozyten können Energie einsparen. Insgesamt wird eine Adaptation der Herzmuskelzelle an ischämische Zustände erreicht (213;68;76). Von größter Bedeutung ist dieser Mechanismus v.a. für die physiologische Anpassung des Herzens unter Stress. Der elektrische Rückkopplungsmechanismus verhindert im Myokard eine Calciumüberladung und sorgt für die Homöostase der Zelle. Somit kann eine Einschränkung der Leistungsfähigkeit des Herzens verhindert werden (213). In knock-out Mäusen von $K_{IR}6.2$ und SUR2 fand sich keine Adaptation und keine ischämische Präkonditionierung (181).

Des weiteren werden $K_{IR}6.2/SUR2A$ -Kanäle in Skelettmuskelzellen in hoher Anzahl gefunden. Ähnlich wie in den Herzmuskelzellen schützen bei Abfall der ATP-Konzentration die sich öffnenden K_{ATP} -Kanäle vor einer zu starken Erhöhung des intrazellulären Calciums durch Aktionspotentialverkürzung (111;63;29). In der Skelettmuskulatur wird diesen Kanälen bei der Glukoseaufnahme eine weitere wichtige Funktion zugerechnet, die wiederum mit der Glukosehomöostase in Zusammenhang steht.

1.2.5 Regulation der K_{ATP} -Kanäle

1.2.5.1 Nukleotide

K_{ATP} -Kanäle verbinden den Zellmetabolismus mit der elektrischen Aktivität der Zelle, indem der Fluss von Kaliumionen an der Plasmamembran reguliert wird.

Dies geschieht durch verschiedene zytosolische Faktoren, die wichtigsten sind die Nukleotide ATP und ADP. Die ATP-Bindung direkt an die α -Untereinheit ($K_{IR}6.x$) des K_{ATP} -Kanals (195;194) bewirkt eine Schließung der Kanalpore (5). Die Bindungsstelle für ATP konnte mit Hilfe von Mutationsanalysen (200) sowie über einen Vergleich ähnlicher Kanäle ($K_{IR}Bac1.1$, $K_{IR}3.1$) von Antcliff et al. (2005) als Modell aufgestellt werden (5). Es finden sich insgesamt vier Nukleotidbindungsstellen, je eine pro Untereinheit, zwischen den Grenzregionen der einzelnen α -Untereinheiten zwischen C- und N-Terminus (123). Vor allem die Aminosäuren R201 und K185 der C-terminaler Untereinheit und R50 sowie E179 und R301 der N-terminalen Untereinheit konnten als entscheidende Strukturen der ATP-Bindung nachgewiesen werden (198;93;197;5).

Die ATP-Bindung wird ebenfalls von der β -Untereinheit SUR des K_{ATP} -Kanals beeinflusst. Im Oktamer steigert SUR die ATP-Empfindlichkeit gegenüber dem K_{IR} -Tetramer um das Zehnfache (200). Mikhailov et al. (2005) entdeckten in ihrem Strukturmodell von $K_{IR}6.2/SUR1$ eine Spalte, die zwischen zwei SUR-Untereinheiten direkt bis zur im $K_{IR}6.2$ liegenden ATP-Bindungsstelle des zentralen Kanalanteils führte und womöglich einen erleichterten Zugangsweg für ATP darstellt (130).

Im SUR befinden sich zwei NBFs, er besitzt somit zwei Bindungsstellen für Nukleotide (s. 1.2.2.1, s. Abb. 3). An NBF1 findet sich eine Hochaffinitätsbindungsstelle für ATP, die Mg^{2+} -unabhängig ist. An NBF2 wurde hingegen eine Mg^{2+} -abhängige ADP-Bindungsstelle mit niedrigerer Affinität lokalisiert (202). Dort ist auch eine bei NBFs bekannte ATPase-Aktivität entdeckt worden, die als eine Voraussetzung der K_{ATP} -Kanal-Aktivierung gilt (212;130;51). Die ATPase wird aber nicht als Transporter von Substraten gegen einen Konzentrationsgradienten wie sonst bei ABC-Proteinen üblich genutzt, sondern dient als Sensor des Zellmetabolismus und ist in ihrer Aktivität im Vergleich zu anderen ABC-Proteinen deutlich vermindert (125). Als Hypothese und im Vergleich mit anderen ABC-Proteinen wird vermutet, dass der SUR zyklische Änderungen seines Zustandes nach Nukleotidbindung und ATP-Hydrolyse an den NBFs durchläuft (35;115). Die Aktivierung des K_{ATP} -Kanals soll dabei in der posthydrolytischen Phase erfolgen (212;125). $MgADP$ und K_{ATP} -Kanal-Öffner könnten diese Phase stabilisieren oder

induzieren (147;140).

Masia et al. (2005) konnten unterschiedlich hohe ATPase-Aktivitäten zwischen den verschiedenen SUR-Isoformen (SUR1,SUR2A) nachweisen, was auf eine unterschiedliche physiologische Funktion der Kanäle in verschiedenen Geweben schließen lässt (124). SUR1 besitzt im Gegensatz zu SUR2A bzw. SUR2B auch eine sehr viel höhere Affinität zu ATP und ADP (125). Im Vergleich der Spleißvarianten SUR2A und SUR2B zeigt sich eine deutliche höhere Affinität von SUR2B gegenüber ATP an NBF1 und ADP an NBF2 (126;74). Dieser Unterschied kann auf die unterschiedlich hohe Sequenzübereinstimmung der SUR-Isoformen zurückgeführt werden (s. 1.2.2). Mit einer hohen Strukturhomologie von SUR1 und SUR2B und dem Faktum, dass SUR2A und SUR2B nur in den terminalen Aminosäuren variieren, wurde die Hypothese der Beeinflussung der Nukleotidbindung an beiden NBFs durch den C-Terminus aufgestellt. Matsushita et al. (2002) machten hierfür 7 Aminosäuren im Bereich des NBF2 am C-terminalen Ende ausfindig (127). Dadurch kann sowohl die Nukleotid-empfindlichkeit, die ATPase-Aktivität als auch die Interaktion von SUR mit $K_{IR}6.x$ betroffen sein.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass eine K_{ATP} -Kanal-Aktivierung nach bisherigen Erkenntnissen eine funktionsfähige ATPase und eine Interaktion von NBF1 und NBF2 als Voraussetzung benötigt und dass unterschiedliche Nukleotidaffinitäten der SUR-Isoformen vorliegen (212;124;125).

1.2.5.2 Lipide

Lipide haben in der Regelung der K_{ATP} -Kanäle eine wichtige Funktion, indem die K_{ATP} -Kanalaktivität mit dem Metabolismus von Phosphatidylinositolphosphaten (z.B. PIP_2) und langkettigen Acyl-Coenzym-A-Estern (z.B. Oleoyl-CoA) in Zellen verknüpft und reguliert wird. Bei PIP_2 geschieht dies über die intrazelluläre PIP_2 -Konzentration, die wiederum der Regulation von Phospholipidkinasen, Phospholipasen und Phospholipid-Phosphatasen unterliegt (17).

Phosphatidylinositolphosphate und langkettige Acyl-Coenzym-A-Ester bewirken die Aktivierung von K_{ATP} -Kanälen und Erhöhen deren Offenwahrscheinlichkeit

(177). Zu ATP verhalten sie sich wie Gegenspieler, wobei sie die Empfindlichkeit für ATP senken (18;65;114). Als Wirkprinzip wird von einem allosterischen Mechanismus bzw. von einer elektrostatischen Interaktion an den ATP-Bindungsstellen zwischen den Lipiden und ATP ausgegangen (56;177).

K_{ATP} -Kanalmodulatoren sowohl Öffner (z.B. P1075) als auch Blocker (z.B. Glibenclamid) können außerdem von Phosphatidylinositolphosphaten und langkettigen Acyl-Coenzym-A-Estern in ihrer Wirkung gehemmt werden (103;56;177). Dieses Phänomen führten Koster et al. (1999) auf ein physikalisches bzw. funktionelles Entkoppeln von SUR und K_{IR} ($K_{IR6.2}$) zurück, dem vermutlich entweder eine elektrostatische Interaktion oder ein Unterbrechen der Signaltransduktion zwischen SUR und K_{IR} zugrunde liegt (103). Da Polykationen (z.B. Neomycin, Polylysin) jedoch den Phosphatidylinositolphosphateffekt in Bezug auf ATP (183;177), nicht aber auf K_{ATP} -Kanalmodulatoren aufheben können (104), spricht dies für die These einer funktionellen Entkoppelung.

1.2.5.3 Phosphorylierung

Eine Beeinflussung der K_{ATP} -Kanäle durch Phosphorylierung konnte ebenfalls beobachtet werden. An glatten Gefäßmuskelzellen, die an der Gefäßtonusregulation beteiligt sind, können $K_{IR6.1}/SUR2B$ -Kanäle durch körpereigene Vasodilatoren wie Adenosin und Calcitonin über die Proteinkinase A durch Phosphorylierung aktiviert (erhöhte Offenwahrscheinlichkeit) werden (113). Eine signifikant erhöhte Kanalaktivität wurde aber nur bei multipler Phosphorylierung des Kanals gefunden (158). Im Gegensatz dazu konnte eine Hemmung von $K_{IR6.1}/SUR2B$ -Kanälen durch Proteinkinase C, die von Vasokonstriktoren (z.B. Angiotensin) aktiviert wird, beobachtet werden (157;112;196).

Andere Modulatorproteine: wie Kreatinkinasen (47), Lactatdehydrogenasen (47), Syntaxin (48) oder G-Proteine (172) scheinen die K_{ATP} -Kanalaktivität zu verändern und zu beeinflussen. Hier scheinen die Bindungsstellen im Bereich der NFBs zu liegen.

1.3 Pharmakologische Eigenschaften der K_{ATP} -Kanäle

K_{ATP} -Kanäle werden nicht nur intrinsisch durch Nukleotide, Lipide etc. reguliert, sondern sie lassen sich gezielt durch Pharmaka beeinflussen. Ihre große Kanalvielfalt mit unterschiedlichen Subtypen begründet dabei eine außergewöhnliche pharmakologische Breite. In diesem Zusammenhang kann von relativ subtypenspezifischen Inhibitoren und Öffnern gesprochen werden, die in den nachfolgenden Kapiteln genauer erläutert werden sollen.

Einige der K_{ATP} -Kanal-Inhibitoren und K_{ATP} -Kanal-Öffner stehen heutzutage schon für die klinische Praxis zur Verfügung (z.B. Glibenclamid).

1.3.1 K_{ATP} -Kanal-Inhibitoren

Unter die K_{ATP} -Kanal-Inhibitoren fallen Sulfonylharnstoffe und Glinide, die eine Hemmung der Aktivität der K_{ATP} -Kanäle durch Bindung an SUR erreichen. Zur Zeit wird dies pharmakologisch durch die Anwendung der K_{ATP} -Kanal-Inhibitoren in der Diabetes-mellitus-Typ-2-Therapie ausgenutzt. Eine Insulinfreisetzung wird nach Bindung des K_{ATP} -Kanal-Inhibitors an SUR über eine Depolarisation der β -Zellen des Pankreas erreicht (s. 1.2.4.1). Alle K_{ATP} -Kanal-Inhibitoren liegen in ihrer wirksamen Form bei physiologischen Bedingungen als deprotonierte organische Säuren vor (25). Die Bindung von SUR findet im Zytosol der Zellen statt, wobei ein „Flip-Flop-Mechanismus“ der K_{ATP} -Kanal-Inhibitoren angenommen wird (96). Die protonierte Form der Inhibitoren soll ähnlich den Fettsäuren durch die Plasmamembran diffundieren und intrazellulär in die wirksame deprotonierte Form dissoziieren.

Der Wirkungsmechanismus der K_{ATP} -Kanal-Inhibitoren wird am pankreatischen Kanal ($K_{IR}6.2/SUR1$) durch zwei verschiedene Prozesse charakterisiert. Erstens führt die Bindung der K_{ATP} -Kanal-Inhibitoren an ihren Rezeptor (SUR) zu einer Konformationsänderung mit Verschluss der K_{ATP} -Kanalpore. Entscheidender Bedeutung kommt dabei dem N-Terminus des $K_{IR}6.x$ zu, der intakt vorliegen muss, da ansonsten der inhibitorische Effekt der K_{ATP} -Kanal-Inhibitoren ausbleibt. An $K_{IR}6.2$ konnte dies durch Verkürzen der N-terminalen Sequenz um mehr als

10 Aminosäuren von $K_{IR}6.2$ gezeigt werden (13;162). Zweitens beeinflussen K_{ATP} -Kanal-Inhibitoren die Wirkung der auf SURs wirkenden Nukleotide. Ueda et al. (1999) konnten beobachten, dass Glibenclamid die Kooperation an NBF1 und NBF2 (Stabilisierung der Bindung von MgATP an NBF1 durch MgADP an NBF2 mit Aktivierung/Öffnung des K_{ATP} -Kanals) unterbricht (203). An $K_{IR}6.x$, das keinen Angriffspunkt der K_{ATP} -Kanal-Inhibitoren bei therapeutischen Konzentrationen darstellt und durch diese nicht beeinflusst wird, ist die Nukleotidwirkung nicht beeinträchtigt und es wird somit die Blockung des K_{ATP} -Kanals durch K_{ATP} -Kanal-Inhibitoren unterstützt und verstärkt (214;178;7). Die Verstärkung des K_{ATP} -Kanal-Inhibitoren-Blocks durch Nukleotide konnte jedoch an K_{ATP} -Kanälen mit SUR2A nicht nachgewiesen werden. Hier scheinen Nukleotide sogar einen antagonistischen Einfluss gegenüber der K_{ATP} -Kanal-Inhibitoren-Wirkung zu haben (66;49).

Aufgrund von Strukturaktivitätsstudien wird zur Zeit von einem Modell mit zwei Bindungstaschen (A und B, s. Abb. 6) im SUR ausgegangen. K_{ATP} -Kanal-Inhibitoren können entweder an die A-Tasche, die B-Tasche oder die A+B-Tasche binden (25;189;205;208). Strukturell gemein ist allen K_{ATP} -Kanal-Inhibitoren ein zentraler hydrophober Phenylring und ein benachbarter negativer Ladungsträger (Sulfonylharnstoffgruppe oder Carboxylgruppe).

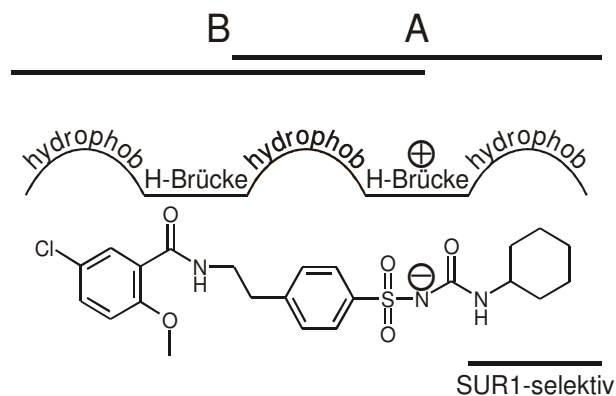


Abb. 6 Stellt ein Modell der Sulfonylharnstoff-Bindungsregion von SUR dar. Aufgrund der Ligandenbeschaffenheit mit bis zu drei lipophilen Strukturen (z.B. GBC) konnte auf die Bindungsregion mit drei korrespondierenden hydrophoben Taschen geschlossen werden. Weitere Struktur- und gezielte Mutationsanalysen im SUR lassen die linke SUR-Tasche in der Region an CL3 und die rechte SUR-selektive Tasche (A-Liganden) an CL8 lokalisieren (vgl. Abb 3).

Es werden drei verschiedene Ligandengruppen unterschieden. Ligandengruppe A (A-Liganden), unter die die kurzkettigen Sulfonylharnstoffe (Tolbutamid, Glibornurid und Gliclacid) und Nateglinid fallen (s. Abb. 7), wird durch zwei hydrophobe Zentren charakterisiert. Diese werden über eine anionische Gruppe verbunden. Als Protonendonator und negativer Ladungsträger dient bei den kurzkettigen Sulfonylharnstoffen eine NH-azide Struktur und den Gliniden eine Carboxylgruppe.

Der genaue Angriffsort (A-Tasche) der A-Liganden am SUR wird in der Region der TMD2 zwischen den Transmembranhelices TM 14 und 16 im CL8 („cytosolic loop 8“) vermutet (s. Abb. 3) (14;9). Vor allem die Aminosäure Serin (an Position 1237) zeigte einen deutlichen Einfluss auf die Bindung mit Tolbutamid.

$K_{IR}6.2/SUR1$ -Kanäle werden normalerweise mit hoher Affinität durch Tolbutamid geblockt, wohingegen $K_{IR}6.2/SUR2$ -Kanäle nicht durch Tolbutamid geblockt werden können. Durch den Aminosäureaustausch Serin zu Tyrosin, der bei SUR2-Isoformen im Wildtyp vorliegt und somit die SUR2-Isoform in dieser Region imitiert, konnte eine vollständige Aufhebung der Kanalblockade erreicht werden (9;32). In Experimenten der S1237Y-Mutante von SUR1 konnte mit Liganden B (s. unten) eine Blockung der K_{ATP} -Kanäle erreicht werden, so dass in der Region CL8 der Inhibitoreinfluss auf die Bindung ausblieb. Folglich wird im Strukturvergleich von Liganden A und Liganden B ein lipophiles Zentrum rechts des zentralen hydrophoben Phenylrings für die SUR1-Selektivität und Bindung in der Region CL8 verantwortlich gemacht (9;77;25).

Daher bezeichnet man die A-Liganden als SUR1-selektiv. Es wird eine lipophile Bindungsstelle für SUR1, die mit analogen passenden lipophilen Zentren der A-Liganden in Verbindung tritt, angenommen (161;32;205).

Aus der Einführung eines weiteren hydrophoben Zentrums in die zentrale Gruppe der Amidgruppe in die A-Liganden resultierte die Ligandengruppe A+B (Liganden A+B). Es handelt sich hier um Sulfonylharnstoffe der zweiten Generation wie Glibenclamid (GBC), Glimepirid oder Gliquidon, die auch als langkettige Sulfonylharnstoffe bezeichnet werden (s. Abb. 7).

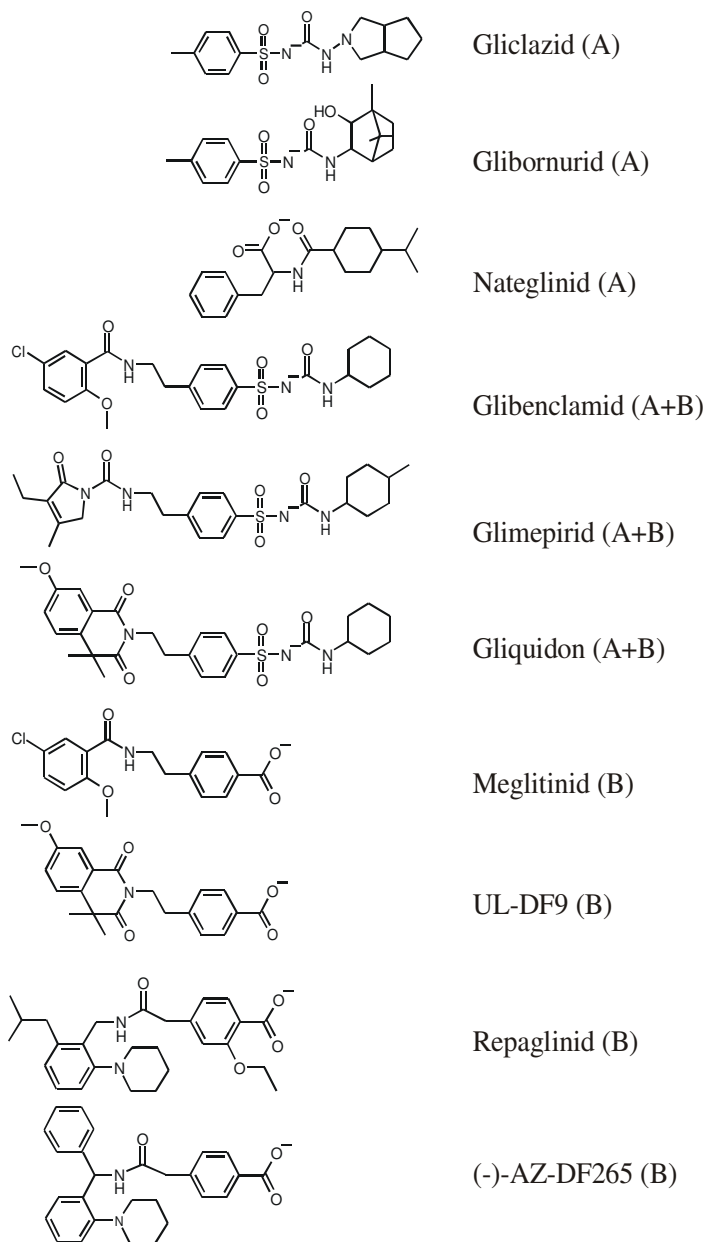


Abb. 7 zeigt Strukturformeln bekannter K_{ATP} -Kanal-Inhibitoren, die nach der Stellung von lipophilen Zentren neben der allen gemeinsamen Phenylgruppe in Ligandgruppen A, A+B und B eingeteilt werden. A-Liganden besitzen rechts neben der Phenylgruppe und ihrem dazugehörigem benachbarten Träger der negativen Ladung, B-Liganden linksseitig, ein weiteres lipophiles Zentrum (s. Abb. 6). Verfügt eine Struktur über alle drei lipophile Zentren gehört sie der Gruppe der A+B-Liganden an.

Im Bindungsverhalten zeigen die Liganden A+B im Vergleich zu den Liganden A eine ungefähr 1000-fach größere Affinität gegenüber SUR. An $K_{IR}6.2/SUR1$ wurde eine „irreversible Bindung“ von GBC postuliert (9;168). Seit mehr als 30 Jahren wurde die Vermutung geäußert, dass zwei Bindungstaschen (A+B) für K_{ATP} -Kanal-Inhibitoren bestehen (71;20;166;24). Es wird zur Zeit von einer Hochaffinitätsbindungsregion (B) und einer Niedrigaffinitätsbindungsregion (A) in SUR ausgegangen, die zusammen eine vielfältige, unspezifische und wahrscheinlich überlappende Bindungstasche bilden (25;208;205).

Die Lokalisation der Regionen wurde im Bereich von CL8 für Bindungsregion A und im Bereich von CL3 für Bindungsregion B angesiedelt (s. Abb. 3). Aguilar-Bryan et al. (1995) fanden in der Region CL3, die zwischen TMD0, TMD1 und in direkter Nachbarschaft zu $K_{IR}6.2$ liegt, ein Photolabeling von ^{125}I -GBC (3) und Mikhailov et al. (2001) konnten durch Mutationen und Restriktionen im SUR1 die Hochaffinitätsbindungsregion dort zuordnen (132). Eine weitere Bestätigung und Eingrenzung dieser Lokalisation wurde von Vila-Carriles et al. (2007) mit Mutationsanalysen vorgenommen (205). Es zeigte sich zwischen Aminosäure 202 und 207 eine hydrophobe Schleife, die für die Bindung und Konformation der Bindungstasche von großer Bedeutung ist. Im Bereich der Aminosäuren 222 und 240, der in allen SUR und in MRP vorhanden ist, scheint eine weitere wichtige Region für hydrophobe Wechselwirkung mit K_{ATP} -Kanal-Inhibitoren zu liegen und ist eine wichtige Region für die Funktion von MRP1 (15). Dort findet sich an den Positionen 230 und 232 Alanin, das zur Inhibitorenbindung am Rezeptor unbedingt notwendig ist. Des Weiteren sollte noch der N-Terminus von $K_{IR}6.x$ genannt werden, bei dem die ersten 100 Aminosäuren eine entscheidende Rolle für die Bildung der Bindungstasche spielen (162;13;205).

Die Sequenzen der einzelnen SUR-Isoformen zeigen keine größeren Unterschiede im Bereich von CL3. Es wird eine unspezifische Interaktion von Benzamidostrukturen der Liganden A+B vermutet (25). Die niedrig affine Bindungsstelle CL8 für Liganden A+B wird dagegen wie bei den Liganden A zwischen den Transmembranhelices TM 14 und 16 lokalisiert. Auch bei der SUR1(S1237Y)-Mutation in $K_{IR}6.2/SUR1$ fand sich mit Liganden A+B eine erniedrigte Affinität bei reversibler Bindung, was Ähnlichkeiten zu Liganden A in

der Bindungsregion A erkennen lässt. Ebenfalls ist eine Mutation in SUR2A und SUR2B zu nennen, bei der Tyrosin durch Serin an Position 1206 substituiert wird. In dieser Mutante ist die Bindungsaffinität von Inhibitoren und die Potenz des Kanalblocks deutlich erhöht (75;188;208).

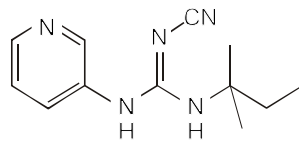
Die hohe Affinität der Liganden A+B und die geringere Reversibilität werden daher durch die Bindung an beide Bindungsregionen A und B der SURs hervorgerufen (9;7). In der Literatur wird die Subtypen-Selektivität der Liganden A+B als relativ gering angegeben (49;152). Dieser Umstand wirft die Frage nach den kardiovaskulären Nebenwirkungen einer Therapie mit Liganden A+B bei einer medikamentösen Diabetestherapie (z.B. Glibenclamid) auf (vgl. 1.4).

Zur Ligandengruppe B (Liganden B) werden Pharmaka wie Repaglinid, (-)-AZ-DF 265, UL-DF 9 und Meglitinid gezählt, deren Bindung als unselektiv in Bezug auf alle SURs bezeichnet werden kann (s. Abb. 7) (49;152). Grundbaustein dieser Verbindungen ist Benzoesäure. Über eine Benzamidstruktur können weitere Reste mit komplexem Muster und unterschiedlicher Größe damit verbunden sein (z.B. Repaglinid) (77). Für die Aktivität der B-, sowie A+B-Liganden scheint der Abstand zwischen Amidstickstoff und anionischer Gruppe wichtig zu sein (25).

In dieser Arbeit wurden aus der Ligandengruppe A Glibornurid und Nateglinid, aus der Gruppe A+B Glibenclamid und aus der Gruppe B Repaglinid, Meglitinid, UL-DF 9 sowie (-)-AZ-DF 265 für die Bindungsstudien verwendet.

1.3.2 K_{ATP} -Kanal-Öffner

K_{ATP} -Kanal-Öffner aktivieren den K_{ATP} -Kanal und bewirken so eine Hyperpolarisation der Zellmembran. Der chemische Aufbau der K_{ATP} -Kanal-Öffner ist ausgesprochen heterogen. Zu ihnen werden unter anderem Cyanoguanidine wie P1075 (s. Abb. 8) und (-)Pinacidil, Benzothiadiazine (Diazoxid), Pyridilnitrate (Nicrorandil), Benzopyrane (Levocromakalim, Bimakalim) oder Pyrimidimsulfate (Minoxidilsulfat) gezählt.



P1075

Abb. 8 Strukturformel P1075 (*N*-cyano-*N'*-(1,1-dimethylpropyl)-*N''*-3-pyridylguanidine)

Ein verbreiteter Einsatz dieser Substanzen im klinischen Alltag ist zur Zeit nicht denkbar, denn ihre Gewebeselektivität ist sehr niedrig und bedingt dadurch ein hohes Nebenwirkungsprofil. Nur Diazoxid und mit Einschränkungen Minoxidil werden trotz dieser negativen Eigenschaft als Medikament bei therapierefraktärer Hypertonie und hypertensiven Krisen eingesetzt. Zur Behandlung von Hyperinsulinämien kann Diazoxid, das als einziger Öffner an SUR1 und SUR2B mit gleicher Affinität bindet, ebenfalls zum Einsatz kommen.

K_{ATP} -Kanal-Öffner binden ebenfalls an die regulatorische Untereinheit SUR, die als Vertreter der ABC-Protein-Superfamilie Liganden ohne hohe Spezifität binden. Eine direkte Aktivierung der Kanalpore an $K_{IR}6.x$ allein durch K_{ATP} -Kanal-Öffner konnte nicht gezeigt werden (200). Mit Glibenclamid konnte nachgewiesen werden, dass die Öffner-Bindung geblockt und dass mit steigender Glibenclamidkonzentration die Dissoziation des Öffners von der Öffnerbindungsstelle beschleunigt wird. Daraus wurde gefolgert, dass keine gemeinsame, sondern eine allosterisch gekoppelte Bindungsregion für Öffner und Inhibitoren besteht (21;52).

Das Bindungsverhalten der K_{ATP} -Kanal-Öffner ist kompetitiv, wobei die Verdrängung in direkter Abhängigkeit der vasodilatierenden Wirkung der Substanzen steht. An SUR1 findet sich mit Ausnahme von Diazoxid und einigen neueren Öffnern eine sehr geringe Affinität zum K_{ATP} -Kanal (148). An SUR2-haltigen Kanälen besteht jedoch eine hohe Affinität und Sensitivität. Experimentell konnte festgestellt werden, dass K_{ATP} -Kanal-Öffner zu SUR2B eine ca. 4-fach höhere Affinität als zu SUR2A besitzen. Dieser Unterschied muss sich aufgrund der Sequenzhomologien auf die letzten 42 C-terminalen Aminosäuren beziehen (179;72).

Der Wirkmechanismus der K_{ATP} -Kanal-Öffner ist bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht vollständig verstanden.

In dieser Arbeit wurde nur P1075 bei den Bindungsstudien verwendet und dabei wurde es nicht als Öffner sondern als Kompetitor wegen seiner hohen Affinität an SUR2B benutzt. In sättigenden Konzentrationen (100 μ M) wird der Radioligand vollständig aus der spezifischen, nicht jedoch aus der unspezifischen Bindung verdrängt.

1.4 Kardiovaskuläres Risiko der Therapie mit K_{ATP} -Kanal-Inhibitoren

Der vorwiegende Einsatz von K_{ATP} -Kanal-Inhibitoren (z.B. GBC) erfolgt in der Therapie des Diabetes mellitus Typ 2. Die Therapie scheint bewährt, doch es gibt bis jetzt Bedenken in Hinblick auf die Verträglichkeit der Substanzen und deren Auswirkungen auf den Organismus (156). Klinische Studien und Beobachtungen scheinen bis jetzt keine eindeutigen Aussagen zuzulassen. Einer besonderen Bedeutung kommt dabei den $K_{IR6.1/SUR2B}$ -Kanälen zugute, da diese sich im gesamten menschlichen Körper in kleineren, peripheren glatten Gefäßmuskeln befinden. Sie spielen dort eine wichtige Rolle in der Regulation des Gefäßtonus und Blutflusses durch endogene und pharmakologische Mediatoren (22).

In der Mikrozirkulation und in Koronargefäßen wird die Kontrolle des Ruhetonus der Gefäßmuskulatur von K_{ATP} -Kanälen beeinflusst (171;91). Die Vasodilatation wird endogen über eine K_{ATP} -Kanal-Aktivierung vermittelt, z.B. durch vasoaktives intestinales Polypeptid (187), Prostazyklin (92;141), Adenosin (129;101) und Calcitonin-gene-related-Peptid (143;136). Diese induziert eine Stimulation der cAMP-Bildung und Aktivierung der Proteinkinase-A mit konsekutiver Phosphorylierung des K_{ATP} -Kanals (22).

Pharmakologisch können K_{ATP} -Kanal-Öffner über eine Hyperpolarisation der Zelle eine Schließung von spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen bewirken, die die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration absenkt und damit eine Vasodilatation

hervorrufen. Dagegen kann sich die Inhibition von K_{ATP} -Kanälen z.B. durch Vasokonstriktoren wie Angiotensin II, Endothelin und Vasopressin (137;138;206) als indirekte Vasokonstriktion infolge einer Inhibition der Proteinkinase-A und Aktivierung der Proteinkinase-C (78) auswirken und einen vasodilatierenden Effekt rückgängig machen.

Eine Aktivierung von K_{ATP} -Kanälen scheint besonders in pathophysiologischen Zuständen der Zelle wie Hypoxie (50), Ischämie (97;16), Azidose (89;100) oder septischem Schock (107) zu existieren. Dieser Mechanismus dient der Aufrechterhaltung der Gewebepfusion. Schnitzler et al. (2000) entdeckten das Vorkommen von K_{ATP} -Kanälen in Endothelzellen, die sich aus $K_{IR}6.1$ oder $K_{IR}6.2$ und SUR2B zusammensetzen. Eine Kanalaktivierung führt in diesen Zellen zur Hyperpolarisation und einem Einstrom von Ca^{2+} . Erhöhte Ca^{2+} -Konzentrationen induzieren die Synthese von NO und anderen vasoaktiven Substanzen, die die Gefäßpermeabilität erhöhen (120;175). Mit dem Wissen dieser Mechanismen der Gefäßregulation konnten Brayden et al. (2002) zeigen, dass der koronare Blutfluss durch Glibenclamid-induzierte Vasokonstriktion bei Ruhetonus erniedrigt wird (22).

So existieren zum Beispiel Anzeichen für reduzierte ST-Streckenerhöhung im EKG von Patienten mit akutem Myokardinfarkt bei gleichzeitiger Therapie mit Sulfonylharnstoffen (83). Dadurch könnte die Aussagekraft des EKG bei der Infarkt diagnose beeinträchtigt werden.

Eine mögliche Minderung der ischämischen Präkonditionierung (42), sowie eine Reduktion des koronaren Blutflusses in Ruhe (57) und während einer Hypoxie (135) gehören zu weiteren potentiellen unerwünschten Nebenwirkungen der Diabetesbehandlung mit K_{ATP} -Kanal-Inhibitoren. Obgleich kleinere Studien (59;6) in der Tat Hinweise auf Gefahren des Sulfonylharnstoff-Einsatzes bei Patienten mit erhöhtem kardiovaskulärem Risiko erbrachten, zeigten ausgedehnte Studien wie die UKPDS (1998) keine Häufung bzw. Verschlimmerung kardiovaskulärer Ereignisse unter einer Sulfonylharnstoff-Therapie (1), auch nicht bei Hochrisikopatienten (190). Andererseits zeigte eine retrospektive Analyse kanadischer Patientendaten eine Erhöhung der Mortalität unter Behandlung mit Sulfonylharnstoffen aber nicht mit Metformin (184).

Eine genauere Zuordnung der Wirkstoffe hinsichtlich ihrer Subtypenselektivität und deren Effekte und Risiken auf das kardiovaskuläre System wurde in klinischen Studien bisher nicht vorgenommen. In bezug auf dieses Thema sind noch einige andere Faktoren von Bedeutung. Trotz der ausgeprägten SUR1-Selektivität von Tolbutamid (s. 1.3.1) (152) gibt es Anzeichen für erhöhte Sterblichkeit bei Typ-2-Diabetikern, die mit dem A-Liganden (Tolbutamid) behandelt wurden (128;184). Möglicherweise könnte eine potentielle Wechselwirkung von Tolbutamid mit den wenig erforschten mitoK_{ATP}-Kanälen oder anderen Zielproteinen die Mortalitätserhöhung erklären.

1.5 Fragestellung

K_{ATP} -Kanalsubtypen finden sich auf vielen Zellentypen des menschlichen Körpers. Bei der klinischen Anwendung von Sulfonylharnstoffen und Gliniden als orale Antidiabetika soll selektiv der pankreatische K_{ATP} -Kanal ($K_{IR}6.2/SUR1$), nicht aber der kardiovaskuläre K_{ATP} -Kanal (z.B. der in der Gefäßmuskulatur, $K_{IR}6.1/SUR2B$) gehemmt werden. Die in der Literatur beschriebenen geringe Selektivität von Glibenclamid und Repaglinid ist daher sehr erstaunlich, da man bei ihrer Anwendung mit kardiovaskulären unerwünschten Arzneimittelwirkungen rechnen müßte. Um die Selektivität ausgewählter K_{ATP} -Kanal-Inhibitoren aus den drei Ligandengruppen (Typen A, A+B und B) neu zu bestimmen und besser zu verstehen, wurden in unserer Arbeitsgruppe die Bindung an die SUR-Subtypen sowie an den kompletten Kanal ($K_{IR}6.x/SURx$) sowie die Kanalhemmung gemessen.

In dieser Arbeit wurde die Bindung der K_{ATP} -Kanal-Inhibitoren an den vaskulären Kanal ($K_{IR}6.1/SUR2B$) in Radioligandenbindungsstudien untersucht. Da jedoch die Affinität von SUR2B für den Radioliganden [3H]Glibenclamid mit ~20-40 nM zu gering für gute Messungen ist, wurde die Mutante SUR2B(Y1206S) eingesetzt. Diese Mutation erhöht die Affinität von SUR2B für Glibenclamid um einen Faktor 5-10, läßt aber ansonsten die Eigenschaften des Kanals unverändert (75;188;208).

Die Radioligandenbindungsstudien wurden an intakten HEK293-Zellen, die SUR2B(Y1206S) und $K_{IR}6.1/SUR2B(Y1206S)$ exprimieren, bei 37 °C durchgeführt. Folgende Liganden wurden untersucht: Liganden A+B (Glibenclamid), Liganden A (Nateglinid, Glibornurid) und Liganden B (Repaglinid, Meglitinid, UL-DF9, (-)-AZ-DF265). Ferner wurde noch die Bindung von Glibenclamid und Repaglinid an den ($K_{IR}6.2/SUR2B(Y1206S)$)-Kanal (glattmuskulär außer Gefäß) gemessen.

Aus den Ergebnissen (K_D - bzw. pK_D -Werte) lassen sich folgende Fragen beantworten:

-
- (a) Wie ist die Affinität der verschiedenen Hemmstoffe an den (mutierten) Gefäßkanal?
 - (b) Wie ist die Selektivität der Bindung der Hemmstoffe an die Kanalsubtypen (durch den Vergleich mit anderen Meßserien)?
 - (c) Wie ist der Effekt der Koexpression mit $K_{IR}6.1$ auf die Affinität der Substanzen für SUR2B(Y1206S)?
 - (d) Wie ist der Unterschied der beiden $K_{IR}6.x$ -Komponenten in der Koexpression mit SUR2B(Y1206S) auf die Affinität für Glibenclamid und Repaglinid?

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Geräte und Hilfsmittel

Tab. 2 Tabelle der verwendeten Geräte u. Hilfsmittel

Geräte/ Hilfsmittel	Hersteller, (Herstellungsland)
Autoklav	2540 MK; Tuttnauer, Wesel, (D)
Brutschrank	B5060EC/CO ₂ ; Heraeus Instruments GmbH, Stuttgart, (D)
Feinwaage	Precisa 100A-300M; PAG Oerlikon, (CH)
Filtrationsapparatur	H. Hölzer Laborgeräte; Dorfen, (D)
Filtrationsvakuumpumpe	N 026.3; KNF Neuberger, Freiburg, (D)
Glasfaserfilter	Whatman GF/C, Inc. , Clifton, NJ (USA)
HEK-Zelllinie (Kat.-Nr. DSMZACC305)	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, (D)
Petrischalen (9.4 cm Durchmesser)	Fa. Greiner, Frickenhausen, (D)
Sterilbank mit laminar-air-flow	Hera Safe; Heraeus Instruments GmbH, Stuttgart, (D)
Spektralphotometer	Hitachi U-3000
Stickstofftank	XLC 511-FD; Chart Europe GmbH, Solingen, (D)
Szintillationszähler	TRI-CARB [®] Liquid Scintillation Analyser 2000CA; Packard, (USA)
Tiefkühltruhe	GFL 6384; GFL GmbH, Burgwedel, (D)
Wasserbad	Medingen W12; P-D Industriegesellschaft GmbH, Dresden, (D)
Zentrifuge	Biofuge Primo; Heraeus Instruments GmbH, Osterode, (D)

2.2 Reagenzien/Chemikalien

Tab. 3 Tabelle der verwendeten Reagenzien

Reagenzien	Hersteller, Herstellungsland
BSA (bovines Serumalbumin)	Fluka, Buchs, (CH)
CaCl ₂	Merck, Darmstadt, (D)
CuSO ₄	Merck, Darmstadt, (D)
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Merck, (USA)
EDTA-Na ₂ (Ethylen-diamin-tetraacetat-Na ₂)	Fluka, Buchs, (CH)
Ethanol 99% p.a.	Merck, Darmstadt, (D)
FBS (fötales bovines Serum)	GibcoBRL-Life Technologies, Paisley (UK)
Folin-Ciocalteau-Reagenz (2 M)	Fluka, Buchs, (CH)
D(+)-Glucose*H ₂ O	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, (D)
HCl	Fluka, Buchs, (CH)
HEPES (N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-ethansulfonsäure)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, (D)
K ⁺ /Na ⁺ -Tartrat	Merck, Darmstadt, (D)
KCl	Merck, Darmstadt, (D)
Lipofectamin™2000	Invitrogen, Karlsruhe, (D)
MEM (Minimum Essential Medium)+ L-Gln + Earle's Salze	Invitrogen, Karlsruhe, (D)
MgCl ₂ *6 H ₂ O	Merck, Darmstadt, (D)
NaCl	Merck, Darmstadt, (D)
Na ₂ CO ₃	Merck, Darmstadt, (D)
NaOH	Merck, Darmstadt, (D)
OptiMEM 1	Invitrogen, Karlsruhe, (D)
TRIS (Tris-hydroxymethyl-aminomethan)	Fluka, Buchs, (CH)
Ultima Gold™	Perkin Elmer, Boston (MA), (USA)

2.3 Puffer

Die Lagerung sämtlicher Puffer erfolgt bei 2-8°C im Kühlraum.

2.3.1 Puffer zur Herstellung der Geneticin-Stammlösung

HEPES	100 mM
-------	--------

Zuerst wird der pH-Wert von HEPES bei Raumtemperatur mit NaOH auf 7,4 eingestellt. Die Lösung wird dann bei 121°C und 1,1-1,2 bar über eine Stunde autoklaviert.

2.3.2 Isotoner Puffer zur Präparation von HEK293-Zellmembranen

HEPES	5 mM
KCl	5 mM
NaCl	139 mM

Die Substanzen werden in Aqua demin. gelöst und der pH-Wert bei 37°C auf 7,4 eingestellt. Die Lagerung erfolgt bei 2-8°C. Der Puffer findet sowohl bei der Inkubation der Reaktionsansätze bei Bindungsstudienexperimenten, als auch zur Herstellung der wässrigen Substanzverdünnungsreihe Anwendung.

2.3.3 Inkubationspuffer für Radioligandbindungsstudien an HEK293-Zellen

CaCl ₂	1,25 mM
D(+)-Glucose*H ₂ O	11 mM
HEPES	10 mM
KCl	5 mM
MgCl ₂	1,2 mM

NaCl	129 mM
NaHCO ₃	5 mM

Alle Substanzen außer Glukose und CaCl₂ werden in Aqua demin. gelöst. Der pH-Wert wird nach 30-minütiger Carbogen-Begasung bei 37°C auf 7,4 mit NaOH (1 M) titriert. Danach wird D(+)-Glucose*H₂O und CaCl₂ hinzugefügt und der so hergestellte Puffer wird über die gesamte Versuchszeit bei 37°C begast.

2.3.4 Waschpuffer zum Auswaschen nicht gebundener Radioaktivität und zum Inkubationsstopp

TRIS	50 mM
NaCl	154 mM

Der Waschpuffer wird aus einer zehnfach konzentrierten Stammlösung durch Verdünnung der Stammlösung mit Aqua demin. im Verhältnis 1:10 hergestellt. Er wird im Kühlraum bei 2-8°C über Nacht gekühlt. Am folgenden Tag wird der pH-Wert auf 7,4 bei 4-6°C eingestellt.

2.4 Synthetische K_{ATP}-Kanalmodulatoren

Aus den K_{ATP}-Kanalmodulatoren (s. Tab. 4) werden Stammlösungen verschiedener Konzentrationen (Verdünnungsreihe) in einem Ethanol/DMSO-Gemisch (Verhältnis 1:1) hergestellt. Aliquots dieser Lösungen pipettiert man je nach geforderter Konzentration im Inkubationspuffer direkt oder über eine weitere Verdünnung in die Reaktionsansätze. Die Stammlösungen werden mit NaOH neutralisiert.

Tab. 4 Tabelle der verwendeten Medikamente und Liganden (Kanalmodulatoren)

Medikamente	Hersteller, Herstellungsland
(-)-AZ-DF 265	Thomae, Biberach, (D)
Glibenclamid	Sigma Aldrich, Taufkirchen, (D)
Glibornurid	Hoffmann-La Roche, Basel, (CH)
Gliclazid	Technologie, Servier, Paris, (F)
Glimepirid	Sanofi Aventis, Frankfurt a. M., (D)
Meglitinid	Sanofi Aventis, Frankfurt a. M., (D)
Nateglinid	Novartis, (CH)
P1075	Leo Pharmaceuticals, (DK)
Repaglinid	Novo Nordisk, (DK)
UL-DF 9	Thomae, Biberach, (D)

2.5 DNA-Plasmide

Die in nachfolgender Tabelle aufgeführten Plasmide wurden für die transienten Transfektionen (s. 2.7.2) verwendet:

Tab. 5 Tabelle der verwendeten cDNA, der mutierte SUR2B(Y1206S) wurde hergestellt mit Hilfe des QuickChange Site-Directed Mutagenesis Systems (Stratagene, Amsterdam, NL) von Frau Dr. A. Hambrock

cDNA (Genbank-Nr.)	Spezies	Vektor	Vektorgröße (in kb)	Ursprungslabor
K _{IR} 6.1 (D88159)	Maus	pcDNA3.1(+)	7.100	Y. Kurachi & Y. Horio (Osaka)
K _{IR} 6.2 (D50581)	Maus	pcDNA3.1(+)	6.692	Y. Kurachi & Y. Horio (Osaka)
SUR2B(Y1206S)	Maus	pcDNA3.1(+)	11.400	Y. Kurachi & Y. Horio (Osaka) & Mutante v. A. Hambrock und U. Quast

2.6 Medien/Stammlösungen

2.6.1 Kulturmedium für HEK293-Zellen

MEM + L-Gln + Earle's Salze	90%
FBS	10%
Gentamycin	20 µg/ml

Zuerst wird das MEM mit dem hitzeinaktivierten und im Kühlschrank gelagerten FBS versetzt. Das fötale bovine Serum (FBS) dient als Zusatz für die Kultivierung von HEK293-Zellen, da es wachstumsfördernde mitogene Faktoren enthält. Eine generelle Lagerung des FBS erfolgt bei -20°C . Bevor es dem Zellkulturmedium zugefügt werden kann, muss es erst aufgetaut und dann im Wasserbad bei 55°C für 1,5 Stunden unter gelegentlichem Schütteln hitzeinaktiviert werden. Dieses Prozedere zur Aufbereitung bewirkt einen Stop möglicher Restaktivitäten von Serumproteasen. Danach erfolgt eine Aufbewahrung bis zur weiteren Verwendung im Kühlschrank bei $2-8^{\circ}\text{C}$.

Dann wird als Schutz vor bakterieller Besiedelung des Kulturmediums Gentamycin zugesetzt. Dieses Aminoglykosidantibiotikum hemmt die bakterielle Proteinsynthese und wirkt als Breitbandantibiotikum auf viele grampositive und -negative Bakterien (auch mehrere Mykoplasmenstämme), nicht jedoch gegen Hefen, Schimmelpilze und Protozoen. Die Toxizität gegenüber HEK293-Zellen ist gering und das Antibiotikum ist bei 37°C relativ lange stabil (ca. zwei Wochen). Da es autoklaviert werden kann, ist es hervorragend für den Einsatz bei Zellkulturen geeignet. Mit Aqua bidest. werden aus der käuflich erworbenen Stammlösung ($c = 50 \text{ mg/ml}$) 6-ml-Gentamycinstammlösungen ($c = 2 \text{ mg/ml}$) durch Verdünnen hergestellt und die gewünschte Menge aus diesen dem Kulturmedium zugefügt. Die Gentamycinstammlösungen werden bei -20°C aufbewahrt.

Die hergestellten Kulturmedienflaschen (500 ml MEM + 56 ml FBS + 5,6 ml Gentamycin (2 mg/ml)) werden im Kühlschrank bis zur weiteren Verwendung gelagert. Ein vom Hersteller dem Kulturmedium zugesetzter Indikator (Phendrot)

zeigt durch einen Farbumschlag nach orange/gelb an, ob eine mikrobielle Kontamination mit deren weitestgehend sauren Stoffwechselprodukten stattgefunden hat. Kommt es zu einem Farbumschlag nach pink, wird ein pH-Wert-Anstieg durch längeren Kontakt mit Sauerstoff angezeigt.

2.6.2 Inkubationsmedium für HEK293-Zellen

MEM	90%
FBS	10%

Zur Herstellung des Inkubationsmediums werden das MEM und das hitzeinaktivierte FBS im oben angegebenen Verhältnis gemischt. Verwendung findet dieses Medium bei der Transfektion der Zellen.

2.6.3 Gefriermedium zur Kryokonservierung von HEK293-Zellen

Gefriermedium A	MEM mit 40% FBS
Gefriermedium B	MEM mit 20% DMSO

Wie in Kapitel 2.7.4 beschrieben, werden die Medien zu gleichen Teilen mit den HEK293-Zellen gemischt. Dadurch wird eine Endkonzentration von 20% FBS und 10% DMSO erreicht.

2.6.4 Stammlösungen für die Proteinbestimmung nach Lowry

Lowry A	Na_2CO_3 , 2% in 0,1 M NaOH
Lowry B	CuSO_4 , 1% in Aqua bidest.
Lowry C	K^+/Na^+ -Tartrat, 2% in Aqua bidest.
Lowry D	Folin-Ciocalteu-Reagenz (2 M)

Lowry A bis C werden als Stammlösungen hergestellt, bei Raumtemperatur aufbewahrt und für die Herstellung der Lösungen Lowry E und F verwendet. Die Lösungen E und F werden jeweils frisch für die Proteinbestimmung angesetzt.

Lowry E	Lowry A:	98 Anteile
	Lowry C:	1 Anteil
	Lowry B:	1 Anteil

Um ein Ausflocken der Lowry-E-Lösung zu verhindern, muss die Reihenfolge A-C-B der Lowry-Lösungen bei der Herstellung strikt eingehalten werden.

Lowry F	Lowry D:	1 Anteil
	Aqua bidest.:	1 Anteil

2.7 HEK293-Zellen

Die in den Experimenten benutzten HEK293-Zellen entstammen humanen embryonalen Nierenzellen. Durch tumoröse Transfizierung mit dem DNA-haltigen Adenovirus Typ 5 wurden sie immortalisiert (62). Der Bezug der HEK-Zelllinie (Kat.-Nr. DSMZACC305) erfolgte von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH in Braunschweig.

Alle Arbeiten an lebenden HEK293-Zellen werden an einer Sterilbank mit laminar-air-flow unter sterilen Bedingungen und mit sterilem Material durchgeführt. Vor allen Arbeitsschritten lässt man die Sterilbank für ca. 30 Minuten laufen, um die gewünschten sterilen Arbeitsbedingungen herzustellen.

Die Konfluenz der HEK293-Zellen wird unter dem Mikroskop beurteilt und die Kulturschalen werden auf eine Kontamination durch Pilze oder Bakterien untersucht.

Bei den Radioligandbindungsstudien werden HEK293-Zellen verwendet, die den

Subtyp SUR2B(Y1206S) permanent exprimieren, sowie HEK293-Zellen, die transient mit SUR2B(Y1206S) und den K_{ATP} -Kanaluntereinheiten $K_{IR}6.1$ bzw. $K_{IR}6.2$ kotransfiziert werden. Die permanente Zelllinie wurde von der Arbeitsgruppe Frau Dr. Hambrock (Pharmakologisches Institut des Universitätsklinikums Tübingen), wie in Hambrock et al. (1998) beschrieben (73), hergestellt und freundlicherweise für die Studien zur Verfügung gestellt.

Auf dem Plasmid (pcDNA3.1(+), Invitrogen), mit dem die HEK293-Zellen permanent transfiziert werden, befindet sich einerseits die für die jeweilige β -Untereinheit eines K_{ATP} -Kanals kodierende cDNA und andererseits ein Resistenz-Gen für das Antibiotikum Geneticin zur Selektion. Der Zusatz von Geneticin erfolgt, um nach der erfolgreichen permanenten Aufnahme des Plasmids in die HEK293-Zellen mit deren Expression das Überleben der permanent transfizierten HEK293-Zellen unter Geneticin-Selektionsdruck (Geneticin wirkt auch auf Säugerzellen toxisch) zu ermöglichen.

2.7.1 Kultivierung von HEK293-Zellen

Die Kultivierung der HEK293-Zellen erfolgt in einem Brutschrank (37°C; 5% CO₂) in Petrischalen aus Plastik mit 9,4 cm Durchmesser (Fa. Greiner, Frickenhausen, (D)) in 10 ml Kulturmedium für HEK293-Zellen (s. 2.6.1). Die Atmosphäre des Brutschranks wird mit CO₂ auf ein Luft-CO₂-Verhältnis von ~5% begast und befeuchtet (95% relative Luftfeuchtigkeit). Eine Zellpassage erfolgt bei Erreichen einer Zellkonfluenz von 70-80% (7-10 Millionen Zellen pro Schale) in einem Verhältnis von 1:2 bis 1:4.

Dafür wird zuerst das alte Kulturmedium abgesaugt. Die Zellen werden nun dem Passageverhältnis (1:2 bis 1:4) entsprechend mit 2 bis 4 ml des frischen auf 37°C temperierten Kulturmediums mechanisch vom Schalenboden abgelöst. Jeweils 1 ml der Zellsuspension wird auf 2 bis 4 neue Petrischalen, die mit 9 ml auf 37°C temperiertem Kulturmedium und 100 µl Geneticin vorbereitet worden sind, aufgebracht.

Die Endkonzentration des Geneticins zur Selektion transfizierter von nicht-transfizierten Zellen im Kulturansatz beträgt 300 µg/ml im Kulturmedium. Die

Substanz wird in sterilem Puffer zur Herstellung des Geneticin-Aliquots (s. 2.3.1) in 1 ml Eppendorfgefäßen gelöst und nach dem Aliquotieren im Gefrierschrank bei -20°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

2.7.2 Transfektion von HEK293-Zellen mit LipofectaminTM2000

LipofectaminTM2000 besteht aus kationischen Lipiden, die Mizellen bilden und die zu transfizierende DNA aufgrund ihrer Ladung „umhüllen“. Hierdurch kann die fremde DNA in die HEK293-Zelle aufgenommen und ihre Information abgelesen werden (s. Abb. 9).

HEK293-Zellen werden nach dem Auftauen für die transiente Transfektion mindestens zwei, maximal 40 Mal passagiert. Bei den Transfektionen werden insgesamt 10 µg DNA pro Schale und 37,5 µl Lipofectamin2000TM-Reagenz verwendet. Bei Kotransfektionen mit K_{IR} - und SUR-DNA strebt man molare Plasmidverhältnisse an, die nach der Expression der einzelnen Kanaluntereinheiten eine vollständige Kanalkomplexbildung mit möglichst wenig freiem SUR gewährleisten. Daher wird ein molares K_{IR} /SUR-Verhältnis von größer 1 eingesetzt. Zwingend erforderlich für die korrekte Ermittlung der notwendigen DNA-Mengen ist die genaue Bestimmung der DNA-Konzentration in den verwendeten DNA-Stammlösungen, sowie die Berücksichtigung der jeweiligen Plasmidgröße (s. 2.5).

Zur Vorbereitung der Transfektion der HEK293-Zellen wird am Vortag bei einer Zellkonfluenz von 70-80% das Kulturmedium abgesaugt und gegen 10 ml Gentamycin-freies Inkubationsmedium ausgetauscht. Am darauffolgenden Tag, wenn die Zellkonfluenz 90-95% beträgt, wird die für den entsprechenden Versuch benötigte DNA aufgetaut. Es werden zwei Eppendorf-Reaktionsgefäße (2 ml) mit je 750 µl auf 37°C erwärmtem OptiMEM 1 vorbereitet. In das erste Eppendorf-Reaktionsgefäß werden die DNA-Komponenten suspendiert und vorsichtig mittels Auf- und Abpipettieren gut durchmischt. Dem zweiten Eppendorf-Reaktionsgefäß wird 37,5 µl LipofectaminTM2000 zugefügt und dieser dann für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

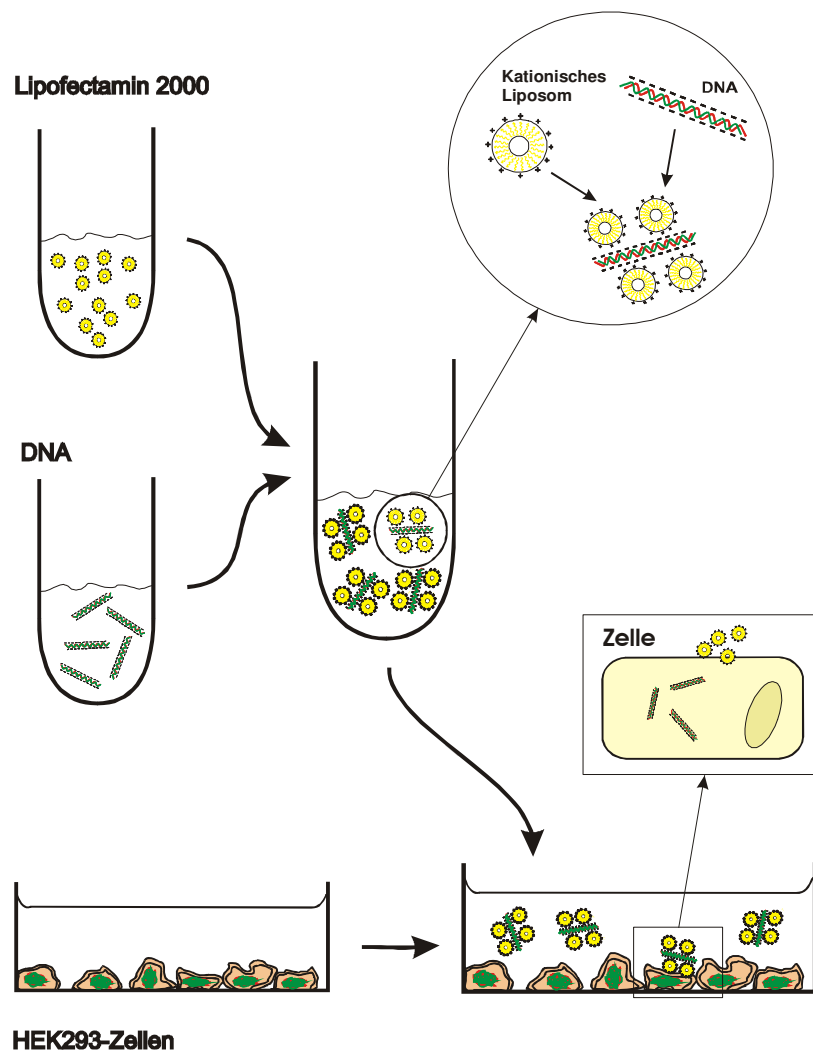


Abb. 9 Die Abbildung zeigt ein Schema der Transfektion von HEK293-Zellen mit Lipofectamin™2000. Zunächst wird ein Gemisch aus Lipofektamin und DNA (K_{IR}/SUR) hergestellt, woraus sich Mizellen bilden. Durch die Mizellen erfolgt die Transfektion der „Fremd-DNA“ in die Zelle (nach Lipofectamin™2000, Invitrogen).

Nach der Inkubation wird die DNA-Suspension der Lipofectamin-Suspension zugegeben und durch Auf- und Abpipettieren ebenfalls vorsichtig gut durchmischt. Es folgt eine weitere Inkubation des DNA-Lipofectamin-Gemisches zur Anlagerung der Mizellen an die DNA für 20 Minuten bei Raumtemperatur. Die zu transfizierenden HEK293-Zellen werden kurz vor Ende der Inkubationszeit aus dem Brutschrank genommen. Es werden pro Schale 4 ml des Inkubationsmediums abgesaugt und das DNA-Lipofectamin-Gemisch wird vorsichtig und

gleichmäßig auf die gesamte Zellkulturplatte aufgetropft. Um eine gleichmäßige Verteilung des DNA-Lipofectamin-Gemisches zu gewährleisten, schwenkt man die Petrischale vorsichtig. Die so transfizierten Zellkulturen werden bei 37°C im CO₂-Brutschrank für zwei Tage bebrütet und dann für Experimente verwendet.

2.7.3 Auftauen von HEK293-Zellen

DMSO ist eine wichtige protektive Substanz zur Konservierung der HEK293-Zellen, die die Zellen bei der Lagerung der im Stickstofftank vor Schädigung schützt. Da DMSO bei Raumtemperatur cytotoxisch auf die HEK293-Zellen wirkt, müssen die Arbeiten mit dieser Substanz äußerst zügig durchgeführt werden, um die Kontaktzeiten damit möglichst kurz zu halten.

Zuerst werden in ein 50 ml Falcon-Tube (Becton Dickinson, New York, USA) mit 20 ml Kulturmedium (37°C) für HEK293-Zellen vorgelegt. Dann entnimmt man die aufzutauenden Zellen im Kryoröhrchen (Cryo's, Greiner Labortechnik) aus dem Stickstofftank (-180°C) und erwärmt sie im Wasserbad (37°C) bis im Röhrchen nur noch ein feiner Eisstift zu sehen ist. Die Zellen werden in das 50 ml Falcon-Tube überführt und bei 500 × g 2-3 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt und das Pellet mit 1 ml Kulturmedium resuspendiert. Danach wird die Zellsuspension in eine Petrischale mit 9 ml Kulturmedium gegeben und im CO₂-Brutschrank bei 37°C für einen Tag inkubiert. Am folgenden Tag wird das Medium gewechselt. Auf eine Selektion mit Geneticin wird bei der ersten Anzucht verzichtet, da dies ein besseres Anwachsen gewährleistet. Die erste Passage der aufgetauten Zellen nach dreitägiger Inkubation wird wie in 2.7.1 durchgeführt, wobei mit der Geneticin-Selektion begonnen wird.

2.7.4 Einfrieren von HEK293-Zellen

Das Einfrieren von HEK293-Zellen kann ab einer Konfluenz von 70-80% einer Zellkulturplatte durchgeführt werden. Pro Kryoröhrchen wird der Zellinhalt einer Petrischale konserviert und eingefroren.

Das alte Kulturmedium der Zellkulturplatte wird abgesaugt und die Zellen mit 4 ml

Gefriermedium A abgelöst. Bei $500 \times g$ werden die Zellen nach Überführung in ein 50 ml Falcon-Tube 2-3 Minuten abzentrifugiert. Danach wird der Überstand unter der Sterilbank abgesaugt, das Zellpellet mit 500 μ l Gefriermedium A resuspendiert, in ein bereits mit 500 μ l Gefriermedium B (enthält DMSO, besondere Handhabung s. 2.7.3) vorgelegtes Kryoröhrchen gegeben, kurz gemischt und auf Eis gestellt. Das Kryoröhrchen wird dann über Nacht bei -80°C in der Tiefkühltruhe zwischengelagert und am darauffolgenden Tag in den Stickstofftank (-180°C) verbracht und dauergelagert.

2.8 Proteinbestimmung nach Lowry

Durch eine Kombination von Biuret-Reaktion mit dem Folin-Ciocalteu-Reagenz wurde 1951 der Lowry-Assay erstmals beschrieben (119).

In alkalischer Lösung entsteht hierbei zuerst ein rotvioletter Farbkomplex aus Kupferionen und Biuretmolekülen, der typische Peptidverbindungen (Peptide, Polypeptide, Proteine) anzeigt. Zur Sensitivitätssteigerung der Biuretreaktion wird dem Kupfer-Protein-Komplex das Folin-Ciocalteu-Reagenz zugesetzt, wobei das Folin-Ciocalteu-Reagenz durch aromatische Aminosäuren (Tyrosin, Tryptophan) reduziert wird. Es entsteht ein Farbumschlag von gelber zu tiefblauer Farbe. Dieser so entstandene Farbstoff wird im Spektralphotometer bei 770 nm gemessen und ist der Konzentration der reagierenden Gruppen (Peptidbindungen) in guter Näherung proportional. Um von der optischen Dichte (OD) auf den Proteingehalt schließen zu können, muss als Grundlage eine Eichgerade mit Standardprotein (BSA) ermittelt werden. Dazu werden unterschiedliche Konzentrationen von BSA in NaOH (0,1 M) als Konzentrationsreihe gelöst und nach Messung der OD die Eichgerade erstellt (s. Abb. 10).

Da sich im Inkubationspuffer, der bei der Proteinbestimmung im Protein-Puffer-Gemisch infolge der Bindungsexperimente vorliegt, HEPES (enthält freie Stickstoffverbindungen, die bei der Proteinbestimmung interferieren) befindet, muss ebenfalls eine Proteinbestimmung der Pufferlösung durchgeführt werden. Die Differenz von Proteinlösungs- zu Pufferlösungsextinktion wird zur Berechnung

der Proteinextinktion verwendet.

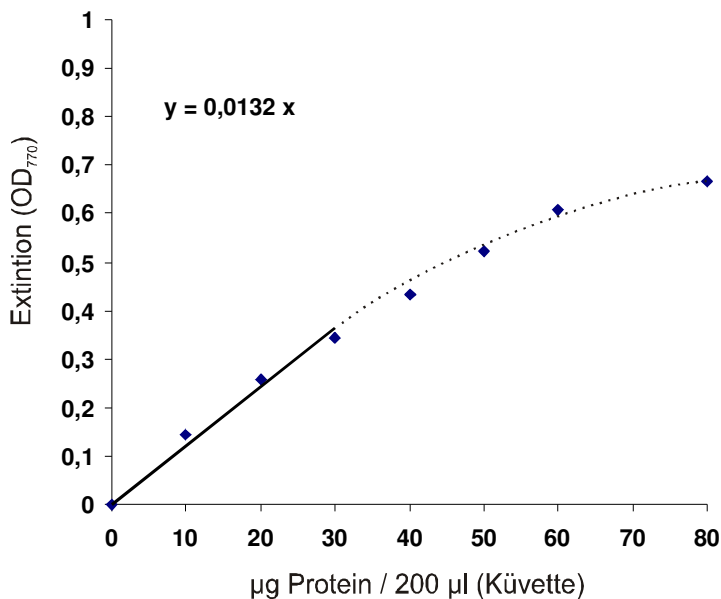


Abb. 10 Eichkurve der Proteinbestimmung (nach Lowry)

Deshalb werden für die Bestimmung des Proteingehaltes der Versuchsproben bei jedem Versuch sowohl 70 µl Zellprotein als auch 70 µl Inkubationspuffer für HEK293-Zellen in jeweils ein Eppendorf-Reaktionsgefäß (2 ml) pipettiert. Diese werden dann 1:10 mit 0,1 M NaOH-Lösung (630 µl) verdünnt. In diesem Mischungsverhältnis liegen die Proteinkonzentrationen im linearen Bereich der Standardmesskurve der Proteinbestimmung und können somit daran bestimmt werden. Da je drei Proben der Protein- bzw. Pufferlösung gemessen werden (von denen man den Mittelwert ermittelt), pipettiert man je 200 µl der Protein- bzw. Pufferlösung in je eine Halbmikroküvette. Dazu wird je 1 ml Lowry E gegeben. Nachdem das Gemisch 5 Minuten inkubiert worden ist, werden 100 µl Lowry F hinzugefügt (s. 2.6.4), die Küvetten mit Parafilm verschlossen und gut durchgemischt. Es folgt eine weitere Inkubation für 20 Minuten. Als Leerwert werden 200 µl einer 0,1 M NaOH-Lösung benutzt, wobei wie mit den Protein- bzw. Pufferlösungen weiter verfahren wird.

Die Messung der Proteinextinktion erfolgt in einem Spektralphotometer bei einer Wellenlänge der Wolframlampe von 770 nm und einer Spaltbreite von 5 nm.

Dabei wird die optische Dichte bei 770 nm (OD_{770}) des Proteins bzw. Puffers gegen den Leerwert gemessen. Anhand der Eichkurve mit dem Standardprotein ist ersichtlich, dass bis zu einer OD_{770} von 0,3 (entspricht ungefähr einer Proteinkonzentration von 30 μg) eine lineare Abhängigkeit besteht. Hier findet sich eine direkte Proportionalität von Extinktion und Proteinkonzentration.

Bei Proteinextinktionen unter 0,3 kann die folgende Funktion nach der Eichgeraden unter Berücksichtigung des Lambert-Beer'schen Gesetzes angewendet werden:

$$OD_{770} = 0,0132 \times c_{\text{Prot}} \quad \text{bzw.} \quad c_{\text{Prot}} = OD_{770} / 0,0132 \quad \textbf{Gleichung 1 + 2}$$

c_{Prot} \triangle Proteinkonzentration in der Küvette ($\mu\text{g} / 200 \mu\text{l}$)

OD_{770} \triangle Proteinextinktion bei 770 nm (Differenz von Proteinlösungs- zu Pufferlösungs-extinktion)

0,0132 \triangle Extinktionskoeffizient (nach Eichgerade Abb. 10)

2.9 Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien

Mit den Radioligand-Rezeptor-Bindungsexperimenten lassen sich durch radioaktiv markierte Substanzen (Radioligand) Rezeptoren lokalisieren, identifizieren und charakterisieren. Da zumeist nur eine extrem geringe Anzahl von den zu untersuchenden Rezeptoren in der Präparation vorliegt, ist eine hohe Ligandenspezifität und -affinität erforderlich. Diesen Ansprüchen muss ein guter Radioligand genügen.

Die experimentelle Grundlage für diese Dissertation bilden Gleichgewichtsexperimente. Vorausgesetzt wird bei Gleichgewichtsexperimenten, dass die Einstellung eines Gleichgewichts gemäß dem Massenwirkungsgesetz erreicht wird. Die Rezeptor-Ligand-Assoziation bzw. -Dissoziation erreicht nach einer gewissen Zeit eine Gleichgewichtslage. Diese ist dadurch gekennzeichnet, dass keine zeitliche Änderung der Bindung mehr beobachtet werden kann. Diese Zeit wird als Inkubationszeit bei Gleichgewichtsexperimenten gewählt. Sie wird von

den kinetischen Konstanten sowie von den Konzentrationen der Reaktionsteilnehmer bestimmt.

Durch Gleichgewichtsexperimente lassen sich sowohl Rezeptoranzahl als auch Affinität von Rezeptor und Radioligand bzw. nicht radioaktiv markiertem Liganden ermitteln. Des Weiteren kann die Assoziation und die Dissoziation als zeitlicher Bindungsverlauf des Radioliganden-Rezeptor-Komplexes anhand ihrer speziellen Kinetik dargestellt werden.

Gleichgewichtsbindungsstudien können die Form eines Sättigungs- oder Konkurrenzexperimentes annehmen. In dieser Arbeit wurden ausschließlich Konkurrenzexperimente durchgeführt, die im folgenden genauer besprochen werden.

2.9.1 Konkurrenzexperiment

In einem Konkurrenzexperiment tritt ein nicht markierter Ligand mit einem Radioliganden um dieselbe spezifische Rezeptorbindungsstelle in „Wettbewerb“. Hierbei kommt es zur gegenseitigen Verdrängung.

Es wird zwischen homologer Konkurrenz, d.h. es konkurrieren radioaktiv markierte und nicht markierte Liganden der gleichen Substanz miteinander, und heterologer Konkurrenz, d.h. „Konkurrenz“ zweier verschiedener Liganden, unterschieden. Eine richtige Konkurrenz entsteht jedoch nur, wenn die konkurrierenden Liganden dem Inkubationsmedium gleichzeitig zugegeben werden. In Experimenten wird meist mit einer Konstanthaltung der Radioligandenkonzentration und einer Konzentrationsveränderung des nicht markierten Liganden gearbeitet.

Die Information, welche ein Konkurrenzexperiment vor allem liefert, ist die halbmaximale Inhibitionskonzentration (IC_{50}), mit der ein nicht markierter Ligand 50% des Radioliganden verdrängt. Die Ermittlung der Dissoziationskonstanten des Gleichgewichtes (K_D) eines nicht markierten Liganden kann nun aus dem IC_{50} -Wert und mit Hilfe der Cheng-Prusoff-Korrektur (s. 2.10.1) bei bekannter Radioligandenkonzentration sowie -affinität (K_D) abgeleitet werden.

Des Weiteren können Hemmkurven eines Konkurrenzexperimentes Hinweise auf

mögliche Heterogenitäten der Bindungsstellen geben.

2.9.2 Radioligandenwahl

Für die geeignete Wahl eines Radioliganden sind bestimmte Voraussetzungen wichtig.

Der Radioligand sollte durch die radioaktive Markierung in seiner physikalisch-chemischen Eigenschaft und biologischen Wirkung möglichst unverändert sein. Gut eignet sich dafür das Radioisotop Tritium (^3H), da es im Gegensatz zu jodierten Liganden zu kaum nennenswerten Veränderungen innerhalb des Ligandenmoleküls durch Ersatz eines ^1H -Atoms gegen ein ^3H -Atom kommt. Tritium hat für Bindungsstudien den weiteren Vorteil, dass durch seine lange Halbwertszeit (12,26 Jahre) im gesamten Versuchszeitraum keine Änderung der spezifischen Aktivität des Radioliganden vorkommt.

Der Radioligand muss über eine hinreichende spezifische Aktivität zu seinem Rezeptor, d.h. über eine hohe Affinität zum Rezeptor, verfügen. Die spezifische Aktivität des Tritiums ist im Vergleich zu radioaktivem Iod (^{125}I) jedoch relativ gering. Sie beträgt nur ca. 50 Ci/mmol. Eine hohe spezifische Aktivität ist nur sinnvoll und vorteilhaft, wenn die Affinität des Radioliganden ebenfalls sehr hoch ist (K_D im nano-/subnanomolaren Bereich). Eine hohe Affinität des Radioliganden wirkt sich in einem günstigen Signal-Rausch-Verhältnis aus und macht es in Konkurrenzexperimenten leichter die Bindungsstärke von niedrigaffinen nicht markierten Liganden zu bestimmen.

Der Radioligand sollte eine möglichst geringe unspezifische Bindung an Nicht-Rezeptor-Material in Bezug auf die totale Bindung aufweisen. Die unspezifische Bindung wird vor allem durch die Lipophilie des Radioliganden bestimmt. Ist die unspezifische Bindung bei hoher Lipophilie stark ausgeprägt, kann dies zur Einschränkung des Radioligandeneinsatzes führen, besonders wenn gleichzeitig eine niedrige Affinität zum Rezeptor vorliegt. Es entsteht ein ungünstiges Signal-Rausch-Verhältnis mit begrenzter Aussagekraft der Ergebnisse. Es gilt somit, dass je höher die Affinität des Rezeptors ist, desto weniger fällt die Lipophilie bzw. unspezifische Bindung ins Gewicht.

Der Radioligand sollte in Gleichgewichtsexperimenten eine reversible Bindung mit seinem Rezeptor eingehen. Bei hochaffinen Radioliganden mit nur langsamer Dissoziationszeit kann die Bindung als irreversibel erscheinen, wenn nicht auf eine ausreichend lange Inkubationszeit geachtet wird. Nur für spezielle Fragestellungen (Isolation und Aufreinigung von Rezeptoren) werden irreversible Bindungen relevant.

In dieser Arbeit wurde für die Bindungsexperimente an den SUR-Typen das mit Tritium markierte Glibenclamid verwendet.

2.9.2.1 ³H-GBC

Glibenclamid (GBC) ist ein langkettiger Sulfonylharnstoff der zweiten Generation (s. Abb. 7), der durch seine Bindung an Sulfonylharnstoffrezeptoren in der Lage ist, K_{ATP} -Kanäle zu inhibieren (s. 1.3.1). Dabei bindet GBC wesentlich stärker an SUR1- als an SUR2-Isoformen (73;74;179;189).

Das in den Experimenten genutzte ³H-GBC wurde mit einer spezifischen Aktivität von 47-52 Ci/mmol und einer Konzentration von 20 µM in Ethanol von der Firma PerkinElmer Life Science (USA) bezogen.

Durch die stark ausgeprägten amphiphilen Eigenschaften von ³H-GBC kommt es leicht zur Haftung an Kunststoffoberflächen der Reaktions- und Aufbewahrungsgefäße. Daher wird, um reproduzierbare Konzentrationen des Radioliganden pipettieren zu können, den Stammlösungen des Radioliganden immer ein Anteil von 10% Ethanol zugesetzt.

Eine weitere experimentelle Schwierigkeit beim Einsatz von ³H-GBC besteht darin, dass die unspezifische Bindung an niedrigaffine Nicht-SUR-Bindungsstellen in der Proteinfraction vor allem bei SUR2-Varianten hoch ist. Folglich ist das Signal-Rausch-Verhältnis aufgrund der relativ niedrigen ³H-GBC-Affinität besonders ungünstig. Zur Quantifizierung der unspezifischen Bindung in SUR2-Experimenten wird deswegen der unmarkierte Öffner P1075 als Hilfsmittel verwendet. Dieser hat in sättigenden Konzentrationen (100 µM) die Eigenschaft den Radioliganden vollständig aus der spezifischen, nicht jedoch aus der

unspezifischen Bindung verdrängen zu können (75;208). Aus der Substraktion von totaler (B_{tot}) und unspezifischer Bindung (B_{s}) lässt sich die spezifische Bindung berechnen.

2.9.3 Durchführung der Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien

Alle Bindungsstudien in dieser Dissertation wurden an ganzen, intakten, lebenden HEK293-Zellen durchgeführt.

Für die einzelnen Experimente mit SUR2B(Y1206S) diente als Grundlage eine HEK293-Zelllinie, die permanent transfiziert SUR2B(Y1206S) stabil exprimierte (s. 2.7) und mit freundlicher Genehmigung von Fr. Dr. Hambrock zur Verfügung gestellt wurde. Pro Versuch wurden drei Schalen mit 60-70%iger Zellkonfluenz benutzt. Diesen wurde dann ca. 2 nM ^3H -GBC mit einer spezifischen Aktivität von 50 Ci/mmol zugesetzt und es wurde inkubiert.

Die Experimente mit $K_{\text{IR}}6.1/\text{SUR2B(Y1206S)}$ und $K_{\text{IR}}6.2/\text{SUR2B(Y1206S)}$ wurden ebenfalls mit HEK293-Zellen durchgeführt. Alle Proteine wurden -im Gegensatz zu den Experimenten mit SUR2B(Y1206S) allein- transient mit Hilfe von Lipofectamin transfiziert (s. 2.7.2) und an der Zelloberfläche exprimiert (s. Tab. 5). Es wurde eine Schale mit einer Konfluenz von 90-100% verwendet. Da bei der Koexpression die Affinität des GBC erhöht ist, wurde die Konzentration des ^3H -GBC erniedrigt, um den Prozentsatz der radioaktiven Bindungen unter 5% zu halten. Nur unter diesen Voraussetzungen konnten die Gleichungen in Kapitel 2.10 zur Anwendung kommen.

Das DNA-Verhältnis von $K_{\text{IR}}6.1$ zu SUR2B(Y1206S) betrug soweit nicht anders angegeben ein Teil zu einem Teil (1:1). Das Verhältnis von $K_{\text{IR}}6.2$ zu SUR2B(Y1206S) betrug zwei zu eins (2:1)

Inkubiert wurden alle Experimente für 30 Minuten bei 37°C mit dem Radioligand ^3H -GBC und einem Kompetitor (Sulfonylharnstoff/Glinid, s. Tab. 4). Der Inkubationspuffer wurde auf einen pH von 7,4 eingestellt, um Gleichgewichtsbedingungen und ein möglichst physiologisches Milieu zu schaffen. Eine Entnahme der Werte für die spezifische (B_{s}) und die nicht-spezifische Bindung (NSB) drei Mal pro Experiment (jeweils am Anfang, während der Hälfte des

Versuches und am Ende). Dies konnte Rückschlüsse auf einen möglichen „Zeittrend“, d.h. eine Änderung von B_s mit fortschreitender Zeit, geben, der durch lineare Interpolation korrigiert werden konnte.

Bei allen Experimenten wurde zur Bestimmung der NSB 100 μ M P1075 verwendet. Alle Versuche wurden ausschließlich von mir und die Versuche mit $K_{IR}6.1/SUR2B(Y1206S)$ und AZ-DF unter Mithilfe von Petra Kühner durchgeführt.

2.9.3.1 Gewinnung von Rezeptormaterial

Zuerst wird das Standardkulturmedium (s. 2.6.1) aus den Kulturschalen mit den zu untersuchenden HEK293-Zellen abgesaugt und die Zellen mit dem zuvor angesetzten Inkubationspuffer (pH 7,4 bei 37°C, 30 Minuten begast, s. 2.3.3) vom Boden der Schale gelöst. Die abgelösten Zellen werden in ein Falcon-Röhrchen (50 ml) überführt und mit Inkubationspuffer auf ein Gesamtvolumen von 20 ml ergänzt. Nach einer 5-minütigen Zentrifugation bei $500 \times g$ wird der Überstand abgesaugt, der Bodensatz in frischen 20 ml Inkubationspuffer vorsichtig aufgenommen und abermals 5 Minuten bei $500 \times g$ zentrifugiert. Nochmals wird der Überstand abgesaugt und das Pellet wird mit einem dem Bindungsversuch angepassten Volumen (Anzahl der Reaktionsansätze \times Volumen der Zellsuspension pro Reaktionsansatz + ca. 10%) des Inkubationspuffers resuspendiert. Die Zellen werden im Wasserbad bei 37°C bis zur Inkubation aufbewahrt und gelegentlich vorsichtig suspendiert.

2.9.3.2 Inkubation

Die Radioligand-Rezeptor-Bindungsreaktion an den intakten HEK293-Zellen wird durch das Zugeben der Zellpräparation (500 μ l) zum Reaktionsansatz (25 μ l Radioligandenstammlösung + 10 μ l unmarkierter Ligand in jeweiliger Konzentration + 475 μ l Inkubationspuffer) gestartet. Die Inkubation wird in Eppendorfgefäßen (2 ml) durchgeführt und erfolgt im physiologischen Temperaturbereich bei 37°C im Wasserbad.

Die Inkubationszeit wurde in Assoziationsexperimenten von Frau C. Löffler-Walz

ermittelt. Dabei wurde untersucht, ab wann sich ein Gleichgewicht von Assoziation und Dissoziation der Liganden einstellt. Je nach Rezeptortyp und Radioligand variiert die Zeit zum Erreichen der Gleichgewichtslage und somit die Inkubationszeit. Bei Experimenten mit intakten ganzen Zellen und ^3H -GBC als Radioligand wird die ermittelte Inkubationszeit auf 30 Minuten festgesetzt.

Sowohl die Radioligand-Stammlösungen (s. 2.9.2.1), wie auch die Lösungen der nicht markierten Liganden (s. 2.4) enthalten Anteile von Lösungsmitteln. Die Zusammensetzung der Reaktionsansätze wird so gewählt, dass der Lösungsmittelanteil 1% nicht übersteigt.

2.9.3.3 Trennung von freiem und gebundenem Radioliganden

Nach Inkubationsende wird der ungebundene Radioligand durch Filtration vom Radioligand-Rezeptor-Komplex getrennt.

Aus den Reaktionsansätzen (je 1.01 ml Volumen, s. 2.9.3.2) werden drei Aliquots (300 μl) entnommen und in jeweils 10 ml eisgekühlten Waschpuffer (s. 2.3.4) überführt. Dies bedingt einen Inkubationsstopp und eine Fixierung der Gleichgewichtslage. Unter einem angelegten Vakuum (Membranpumpe KNF Neuberger Typ N 026.3 AN.18) wird das eisgekühlte Reaktionsgemisch in einer Filtrationsapparatur durch Glasfaserfilter (Whatman GF/C) abgesaugt. Die Filterporen halten aufgrund ihrer Porengröße nur die Zellen zurück. Zur Vermeidung einer erhöhten Messung der unspezifisch gebundenen Radioaktivität werden die Filter mit jeweils 10 ml Waschpuffer zweimal nachgewaschen.

Da pro Reaktionsansatz dreimal filtriert wird, werden die Messpunkte dreifach bestimmt. Aus diesen Ergebnissen (radioaktive Zerfälle pro Minute (dpm), s. 2.9.3.4) wird das arithmetische Mittel gebildet.

2.9.3.4 Messung der Radioaktivität

Die Tritium-Betastrahlung der einzelnen Filter wird mit Hilfe eines Flüssigszintillators (Ultima Gold™, pro Filter 4,5 ml) im Szintillationszähler (TRI-CARB® Liquid Scintillation Analyser 2000CA, Packard) quantitativ erfasst. Das

Prinzip der Messung beruht darauf, dass das radioaktive Analysat seine kinetische Energie der nuklearen Emissionen in Lichtenergie über ein flüssiges chemisches Medium (Flüssigszintillator) überführt (s. Abb. 11).

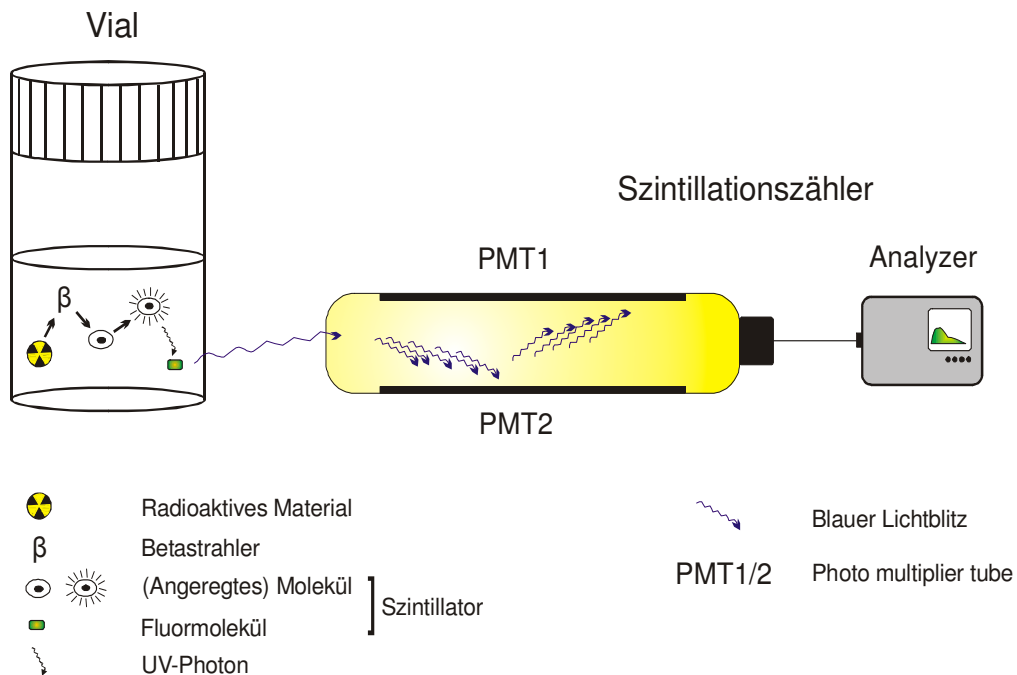


Abb. 11 Darstellung des Prinzips der Messung eines radioaktiven Analysates. Die kinetische Energie der nuklearen Emissionen wird in Lichtenergie über ein flüssiges chemisches Medium (Flüssigszintillator) umgewandelt (nach TRI-CARB® Liquid Scintillation Analyser 2000CA, Packard)

Durch den radioaktiven Zerfall des Tritiums entstehen Betastrahlen, die in dem relativ dichten Medium des Flüssigszintillators schnell ihre ganze kinetische Energie abgeben. Die Energieabsorption vom Szintillator geschieht auf drei verschiedenen Wegen: in Wärme, Ionisation und Anregung. Die Anregung erzeugt Photonen aus UV-Licht, welche wiederum von Fluormolekülen absorbiert werden. Diese angeregten Fluormoleküle emittieren blaue Lichtblitze bevor sie wieder ihren Ausgangszustand erreichen. Die Lichtintensität des Szintillators ist proportional zu der initialen Energie der Betastrahlen.

Zur Messung der blauen Lichtblitze besitzt der Szintillationszähler zwei „Photo multiplier tubes“ (PMTs). Dort treffen die Lichtblitze auf eine Photokathode, in der die Blitze in einen elektronischen Impuls (proportional zu den Lichtblitzen)

umgewandelt werden. Da die Amplitude der PMTs von dem Ort der Emittierung abhängig ist, bedarf es zweier PMTs. Die Signale beider PMTs werden dann bei gleichzeitiger Detektion summiert und es ergibt sich eine Amplitude der elektrischen Impulse, die proportional zu der totalen Intensität der Szintillation ist. Die Amplitude wird dann in einen digitalen Wert, der die Betastrahlenenergie ausdrückt, umgewandelt. Der digitale Wert wird in einem „Analyzer“ mit anderen digitalen Werten verglichen und es kann eine Aussage über die Strahlenenergie und die Menge des radioaktiven Materials gemacht werden.

Vor den Messungen müssen die Glasfaserfilter mindestens 8 Stunden mit dem Flüssigszintillator in Kontakt kommen, denn die Radioaktivität löst sich erst langsam von den Filtern. Nach dieser Ruhezeit können auswertbare Messungen gemacht werden.

Der Szintillationszähler detektiert 54% der Zerfälle pro Minute (dpm):

$$f = 0,54 = \frac{\text{gemessene Impulse / min}}{\text{Zerfälle / min}} = \frac{\text{cpm}}{\text{dpm}}$$

Gleichung 3

Die Zerfälle pro Minute werden in molare und submolare Konzentrationseinheiten zur Auswertung der Bindungsstudien umgerechnet:

$$c = \frac{\text{gezählte dpm}}{2,2 \times 10^{12} (\text{dpm / Ci}) \times \text{SA} (\text{Ci / mmol}) \times V (\text{ml})} = \frac{\text{mol}}{\text{l}}$$

V △ Volumen in ml

c △ Konzentration in mol/l

SA △ spezifische Aktivität des Radioliganden in Ci/mmol

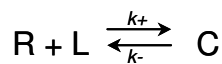
Ci (Curie) △ $2,2 \times 10^{12}$ dpm/min

Gleichung 4

2.10 Modell und Voraussetzung der Rezeptorbindungsstudien

Bei diesem Modell geht man davon aus, dass ein Radioligand (L) gemäß dem Massenwirkungsgesetz an einen Rezeptor (R) bindet. Diese Bindung des Radioligand-Rezeptor-Komplexes (C) ist grundsätzlich reversibel. Hin- und Rückreaktionen werden durch die kinetischen Konstanten für die Assoziation (k_+) und die Dissoziation (k_-) bestimmt.

Die Rezeptorpopulation sei homogen, und es erfolgt keine Interaktion von Bindungsstellen miteinander. Die folgende Gleichung veranschaulicht das Modell:



Gleichung 5

R △ Rezeptor

L △ Radioligand

C △ Radioligand-Rezeptor-Komplex

k_+ △ Assoziationsgeschwindigkeitskonstante ($M^{-1}s^{-1}$)

k_- △ Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante (s^{-1})

Ein Maß für die Stärke der Bindung im Gleichgewicht stellt die Gleichgewichtsdissoziationskonstante (K_D) dar. Es gilt das Massenwirkungsgesetz:

$$K_D = \frac{k_-}{k_+} = \frac{R \times L}{C}$$

Gleichung 6

K_D △ Gleichgewichtsdissoziationskonstante (mol/l)

Weiterhin gelten die Massenbilanzen

$$R_0 = R + C \quad \text{und} \quad L_0 = L + C$$

Gleichung 7 + 8

R_0 △ totale Rezeptorkonzentration (Summe der freien und gebundenen Konzentration)

L_0 △ totale Ligandenkonzentration (Summe der freien und gebundenen Ligandenkonzentration)

Die Experimente werden möglichst so geplant, dass die totale Ligandenkonzentration um ein vielfaches größer als die totale Rezeptorkonzentration ist. Ein Wert von 5% von gebundenem Anteil des Radioliganden sollte daher nicht überschritten werden. Dann ist näherungsweise anzunehmen:

$$L_0 \gg R_0 \quad \Rightarrow \quad L_0 \sim L \quad \textbf{Gleichung 9}$$

Um die spezifische Bindung (B_S) eines Liganden an seinen Rezeptor zu ermitteln, muss sowohl die gesamte Bindung eines Radioliganden (B_{tot}), als auch die unspezifische Bindung (NSB) an andere Bestandteile der Zellpräparation und den Glasfaserfilter bekannt sein. Die NSB wird dadurch bestimmt, dass bei SUR2-Subtypen der unmarkierte Öffner P1075 in sättigenden Konzentrationen (100 μ M) den Radioliganden vollständig aus der spezifischen, nicht jedoch aus der unspezifischen Bindung verdrängt (s. 2.9.2.1).

Die spezifische Bindung errechnet sich folglich aus:

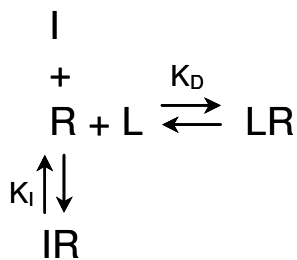
$$B_S = B_{tot} - NSB \quad \Rightarrow \quad B_S \sim C \quad \textbf{Gleichung 10}$$

2.10.1 Modell des Konkurrenzexperimentes

In den Konkurrenzexperimenten (s. 2.9.1) kommt es zu einer Konkurrenz zwischen Radioligand (L) und Inhibitor (I) um nur eine Bindungsstelle am Rezeptor (R). In der Präparation bilden L und I Komplexe mit dem Rezeptor. Es kann sich auf der einen Seite der Radioligand-Rezeptor-Komplex (LR), auf der anderen Seite der Inhibitor-Rezeptor-Komplex (IR) formieren.

In den Experimenten werden L und I gleichzeitig der Zellpräparation zugegeben, und es wird abgewartet bis sich nach einer ausreichenden Inkubationszeit ein Gleichgewicht eingestellt hat. Da die beobachtbare (messbare) Variable LR ist, wird die Abnahme von LR bei steigenden Konzentrationen von I gemessen. Es ergibt sich eine charakteristische Hemmkurve bei der Auswertung.

Folgendes Schema veranschaulicht das Modell:



Gleichung 11

Wenn sich beide Reaktionen im Gleichgewicht befinden, gilt nach dem Massenwirkungsgesetz:

$$K_D = \frac{R \times L}{LR} \quad \text{und} \quad K_I = \frac{R \times I}{IR} \quad \text{Gleichung 12 + 13}$$

Mit der Berücksichtigung der Massenbilanz $R_0 = R + LR + IR$ folgt:

$$\frac{LR}{R_0} = \frac{LR}{R + LR + IR} \quad \text{Gleichung 14}$$

Unter Beachten der Bedingung das L_0 und $I_0 \gg R_0$ sind, wobei die totalen ungefähr den freien Konzentrationen entsprechen sollten.

Durch Umformung und Einsetzen von *Gleichung 12* und *13* ergibt sich:

$$LR = R_0 \times \underbrace{\frac{L / K_D}{1 / L \times K_D}}_{LR(0) \text{ (bei } I=0)} \times \underbrace{\frac{K_I \times (1 / L \times K_D)}{K_I \times (1 / L \times K_D) + I}}_{\text{Sättigung von R mit I (wenn } I \rightarrow 0 \rightarrow 1)}$$

Gleichung 15

Der Mittelpunkt der Hemmkurve (Hyperbel) bei einer InhibitorKonzentration von $I = K_I \times (1 + L/K_D)$ bezeichnet den IC_{50} -Wert. Cheng und Prusoff haben als erste die Beziehung zwischen dem Mittelpunkt der Hemmkurve und der Inhibitoraffinität (K_I) herausgefunden (36).

Durch diese Cheng-Prusoff-Gleichung kann K_I bei bekannter K_D errechnet werden:

$$IC_{50} = K_I \times (1 + L / K_D) \quad \text{Gleichung 16}$$

Bei der homologen Konkurrenz des Radioliganden mit seinem unmarkiertem Analogon und Gleichung 9 gilt:

$$IC_{50} = K_D + L_0 \quad \text{bzw.} \quad K_D = IC_{50} - L_0 \quad \text{Gleichung 17}$$

Die Hemmkurve (Gleichung 15) lässt sich durch Einbringung der Cheng-Prusoff-Gleichung beschreiben als:

$$LR = LR(0) \times \frac{IC_{50}}{IC_{50} + I} \quad \text{und logarithmiert} \quad LR = \frac{LR(0)}{1 + 10^{(pIC_{50} - pI)}}$$

$LR(0)$ \triangleq Bindung des Radioliganden bei $I = 0$

Gleichung 18 + 19

Der Sättigungsgrad y , der in den Experimenten die Fraktion der mit Liganden besetzten Rezeptoren darstellt, ergibt sich als:

$$y = \frac{LR}{R_0} = \frac{L}{L + K} \quad \text{Gleichung 20}$$

Für die maximale Bindungskapazität (B_{max}), die der Gesamtrezeptoranzahl entspricht ($B_{max} \sim R_0$), folgt hieraus:

$$B_{max} = \frac{1}{y} \times B_S = \frac{L + K}{L} \times LR \quad \text{Gleichung 21}$$

2.10.2 Verallgemeinerung der Bindungsisotherme nach Hill

Die Bindungsisotherme, wie sie zuvor beschrieben werden, können im Verlauf steiler oder flacher ausfallen als in den *Gleichungen 18* und *19*. Dies liegt entweder daran, dass ein Radioligand ein komplexeres Bindungsverhalten zeigt, oder dass der Radioligand mit dem nicht markierten Ligand nicht kompetitiv ist. Um die Gleichungen zu verallgemeinern, wird ein Exponent, der Hill-Koeffizient ($n_H = n$), eingeführt.

Für die Inhibitionskurve gilt (s. *Gleichung 19*):

$$B_S = \frac{B_S(0)}{1 + 10^{n(\text{pl}C_{50} - \text{pl})}}$$

Gleichung 22

Hierbei gilt: $B_S(0)$ bezeichnet die B_S zum Zeitpunkt $t = 0$, d.h. in Abwesenheit des unmarkierten Liganden.

Für die Radioligandbindungsstudien lassen sich aus dem Hill-Koeffizienten (n_H) folgende Schlüsse ziehen:

- $n_H = 1$ übliche Bindungsisotherme (es existiert nur eine Klasse von Bindungsstellen, es besteht keine Interaktion zwischen den Bindungsstellen)
- $n_H > 1$ positive Kooperativität (es binden mehrere Ligandenmoleküle mit steigender Affinität an den Rezeptor)
- $n_H < 1$ negative Kooperativität (die Bindung weiterer Ligandenmoleküle wird durch den ersten Liganden erschwert, was in der Natur äußerst selten vorkommt; experimentell wahrscheinlicher ist, dass in der Zellpräparation mehrere Klassen von Bindungsstellen, die sich aber nur gering in ihrer Affinität für den Liganden (ca. Faktor 10-30) vom spezifischen Rezeptor unterscheiden, vorkommen; dies führt zu einer flacheren Hemmkurve, da die einzelnen Komponenten nicht mehr deutlich voneinander getrennt aufgelöst werden können)

2.10.3 Datenauswertung und Statistik

2.10.3.1 Analyse der Bindungskurven

Die in dieser Dissertation ermittelten Versuchsdaten der durchgeführten Radioligand-Rezeptor-Bindungsexperimente wurden mit der Hill-Gleichung analysiert (Modell mit einer Klasse von Bindungsstellen, s. *Gleichung 22* und *23*):

$$y = \frac{A}{1 + 10^{n(\text{pIC}_{50} - \text{pX})}} + (100 - A)$$

Gleichung 23

y △ %B_S (% der spezifischen Bindung)

A △ Amplitude der spezifischen Bindung (maximale Hemmung), bei A = 100 besteht vollständige Hemmung

pX △ - log X (X = Konzentration des homologen bzw. heterologen Inhibitors)

pIC₅₀ △ - log IC₅₀ (IC₅₀ = halbmaximale Inhibitorkonzentration, die den Mittel- bzw. Wendepunkt der Hemmkurve markiert)

n △ Hill-Koeffizient (n_H)

Die oben abgebildete *Gleichung 23* stellt die allgemeine Situation bei Bindungsexperimenten dar. In unseren Experimenten ist die Amplitude der spezifischen Bindung nahe 100% (A ~ 100%) und der Hill-Koeffizient um eins (n_H ~ 1). Diese beiden Parameter werden dann als Konstanten in die Anpassung eingefügt, um die Fehlerquellen für die anderen Parameter möglichst niedrig zu halten.

2.10.3.2 Statistik

Die Amplituden der Verdrängungen (A) und die pK_D- bzw. pK_I-Werte, die aus den IC₅₀-Werten nach der Cheng-Prusoff-Gleichung (s. *Gleichung 16*) ermittelt werden, sind nach Christopoulos normalverteilt (37). Daher können bei der Auswertung die arithmetischen Mittel dieser Werte mit ihren Standardabweichungen der Mittelwerte (SEM, „standard error of the mean“) berechnet werden.

Konfidenzintervalle (95%) der pK_D - bzw. pK_I -Werte werden folgendermaßen berechnet:

$$10^{-y} \quad \text{mit } y = pK_D \text{ (bzw. } pK_I) \pm 2 \text{ SEM} \quad \textbf{Gleichung 24}$$

Eine Darstellung der so gewonnenen Parameter wird in den Ergebnistabellen vorgenommen.

Unter der Voraussetzung der Normalverteilung der Variablen (Smirnow-Kolmogorow-Test), die Amplituden der spezifischen Bindung und die pK_D - bzw. pK_I -Werte, können diese einer Varianzanalyse unterzogen und potenzielle Unterschiede in geeigneten Tests (z.B. student's test) auf ihr statistisches Signifikanzniveau (in Sigma Plot 2000, SPSS Inc., Chicago, USA) untersucht werden.

Die Hemmkurven der Abbildungen in dieser Dissertation werden aus den gemittelten Werten der Einzelexperimente und deren SEM gebildet. An diese Mittelwertkurven werden die entsprechenden Gleichungen der Modelle angepasst. Die in den Mittelwertkurven bestimmten Parameter stimmen meist gut mit den in den Einzelexperimenten gemittelten Parametern überein, sie finden jedoch keine weitere Beachtung.

3 ERGEBNISSE

Die verschiedenen K_{ATP} -Kanalsubtypen werden unterschiedlich von Sulfonylharnstoffen und Gliniden inhibiert. Um festzustellen, ob Unterschiede im Bindungsverhalten zu den Unterschieden in der Kanalhemmung beitragen, wurde die Affinität verschiedener Sulfonylharnstoffe und Glinide für einen Subtyp, den glattmuskulären Typ (SUR2B) untersucht. Dabei erfolgte die Untersuchung an SUR2B allein sowie an den rekombinaten vaskulären und nicht-vaskulären glattmuskulären K_{ATP} -Kanälen ($K_{IR}6.1/SUR2B$ und $K_{IR}6.2/SUR2B$). Die Affinität von GBC zum nativen Rezeptor SUR2B ist nur gering ausgeprägt (~ 30 nM) und folglich wurde die Hochaffinitätsvariante SUR2B(Y1206S) verwendet (s. 2.7) (73). Als Radioligand in den homologen und heterologen Verdrängungsexperimenten wurde 3H -GBC verwendet, da es sich als Sulfonylharnstoff kompetitiv zu den zu untersuchenden Liganden (Typ A, B, A+B; s. 1.3.1, 2.9.2) verhält. Die Bindungsstudien wurden in einem physiologischen In-vitro-System an intakten HEK293-Zellen bei $37^\circ C$ unter einheitlichen Bedingungen durchgeführt. Die unspezifische Bindung (NSB) wurde in Gegenwart des Öffners P1075 ($100 \mu M$) bestimmt (s. 1.3.2, 2.9.2.1) (75;208).

In den homologen Versuchsreihen wird die Gleichgewichtsissoziationskonstante K_D aus der Subtraktion von IC_{50} [nM] und der Labelkonzentration L_0 [nM] errechnet. Bei heterologen Verdrängungsexperimenten wird der Hemmwert des Kompetitors (K_I) mit der Cheng-Prusoff-Gleichung berechnet (s. 2.10).

Die graphischen Darstellungen der Messergebnisse der einzelnen Versuchsreihen, die in SigmaPlot mit den Mittelwerten erstellt wurden, und tabellarische Übersichten der errechneten Mittelwerte über die wichtigsten Parameter zu allen Verdrängungsstudien werden für die jeweiligen Studien vorgestellt.

Die graphischen Darstellungen der Messergebnisse zeigen die Mittelwertsdaten der Einzelexperimente, deren Analyse und die daraus erhaltenen Parameter. In den Tabellen werden hingegen die gemittelten Parameter der Einzelversuche der Serie angegeben, wobei zur Mittelwertbildung die pK_D/pK_I -Werte herangezogen wurden, da die pK -Werte normalverteilt sind (37). Es können daher zwischen den

Parametern in der Figur und denen in der Tabelle leichte Abweichungen auftreten.

3.1 Affinitätsbestimmung von ausgewählten Sulfonylharnstoffen und Gliniden an SUR2B(Y1206S) und K_{IR}6.1/SUR2B(Y1206S)

Der Effekt der Koexpression mit K_{IR}6.1 auf die Bindung von Sulfonylharnstoffen und Gliniden an SUR2B(Y1206S) wurde in diesen Experimentserien an langkettigen Sulfonylharnstoffen (Liganden vom Typ A+B) und kurzkettigen Sulfonylharnstoffen und Gliniden (Liganden vom Typ A, Liganden vom Typ B) untersucht.

3.1.1 Bindung von langkettigen Sulfonylharnstoffen (Liganden vom Typ A+B) an SUR2B(Y1206S) und K_{IR}6.1/SUR2B(Y1206S)

3.1.1.1 Homologe Verdrängung von ³H-GBC durch GBC

Die Auswertung der Bindungsversuche wurde anhand von 4 Experimenten (n=4) an SUR2B(Y1206S)-Zellen und 3 Experimenten (n=3) an kotransfizierten K_{IR}6.1/SUR2B(Y1206S)-Zellen durchgeführt. Die Versuchsdurchführung erfolgte wie in 2.9.3 beschrieben.

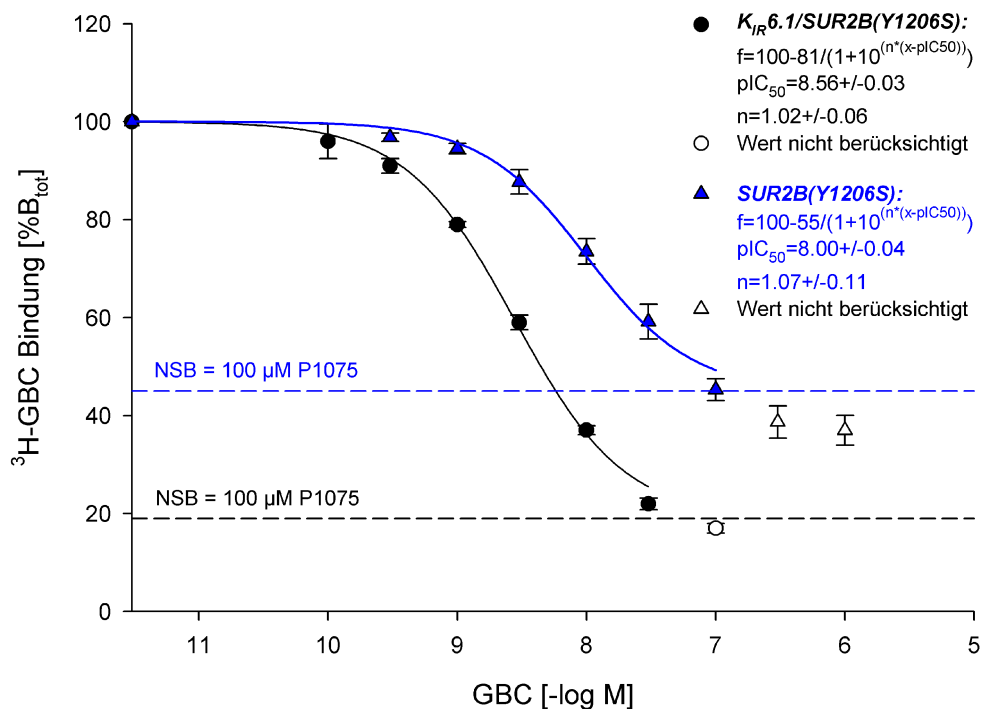


Abb. 12 Hemmung der 3 H-GBC-Bindung durch GBC an SUR2B(Y1206S) und an $K_{IR}6.1/SUR2B(Y1206S)$

Die Kompetitionskurven zeigen graphisch mit Hilfe von SigmaPlot eine Anpassung der Hill-Gleichung an die gemittelten Werte. Die blaue Kurve mit Dreiecken stellt die Bindung von GBC an SUR2B(Y1206S) und die schwarze Kurve mit Punkten die Bindung durch GBC an $K_{IR}6.1/SUR2B(Y1206S)$ bei Koexpression dar. Als Kurvengleichung diente $f=100-B_s(\%)/(1-10^{(n^*(x-pIC_{50}))})$ und die Mittelpunkte der Kurven ergeben die pIC_{50} bzw. pK_D . Tabelle 6 gibt die Mittelwerte der Parameter aus den Einzelexperimenten wieder.

Aus den pK_D -Mittelwerten der Experimente errechnet sich an SUR2B(Y1206S) mit GBC eine pK_D [-log M] von $8,18 \pm 0,06$ und eine K_D [nM] von 6,6 nM (Konfidenzintervall von 5,0 bis 8,7 nM).

Im Vergleich dazu liegt die pK_D [-log M] von $K_{IR}6.1/SUR2B(Y1206S)$ bei $8,71 \pm 0,01$, bzw. einer K_D [nM] von 1,9 nM (Konfidenzintervall von 1,9 bis 2,0 nM).

Daraus ergibt sich eine Steigerung der Affinität von GBC bei Koexpression an $K_{IR}6.1/SUR2B(Y1206S)$ um das 3,5-fache.

Tab. 6 Parametertabelle (Mittelwerte der Einzelerperimente \pm SEM) der homologen Hemmung der ^3H -GBC-Bindung durch GBC an SUR2B(Y1206S) und $K_{\text{IR}6.1}$ /SUR2B(Y1206S)

GBC	L_0 [nM]	NSB (% B_{tot})	B_{tot} (fmol/mg)	pIC_{50} [nM]	pK_D [-logM]	K_D [nM]	n_H	n
SUR2B(Y1206S)	$3,10 \pm$ 0,10	$44 \pm$ 3	$367 \pm$ 90	$8,01 \pm$ 0,04	$8,18 \pm$ 0,06	6,6	$1,1 \pm$ 0,04	4
$K_{\text{IR}6.1}$ / SUR2B(Y1206S)	$1,03 \pm$ 0,05	$19 \pm$ 1	$225 \pm$ 10	$8,53 \pm$ 0,01	$8,71 \pm$ 0,01	1,9	$1,0 \pm$ 0,03	3

Die K_D (6,6 nM für SUR2B(Y1206S)/1,9 nM für $K_{\text{IR}6.1}$ /SUR2B(Y1206S)) von GBC wurde in den folgenden Verdrängungsexperimenten zur Ermittlung der Dissoziationskonstanten nach der Cheng-Prusoff-Gleichung (s. Kapitel 2.10, Gleichung 16) benutzt.

3.1.2 Bindung von Liganden vom Typ A an SUR2B(Y1206S) und $K_{IR}6.1/SUR2B(Y1206S)$

3.1.2.1 Heterologe Verdrängung von 3H -GBC durch Glibornurid

Beide Verdrängungsversuchsreihen, sowohl diejenigen mit SUR2B(Y1206S)- als auch mit $K_{IR}6.1/SUR2B(Y1206S)$ -Zellen, wurden mit einer Versuchszahl von drei ($n=3$) durchgeführt. Die Versuchsdurchführung erfolgte wie in 2.9.3 erklärt.

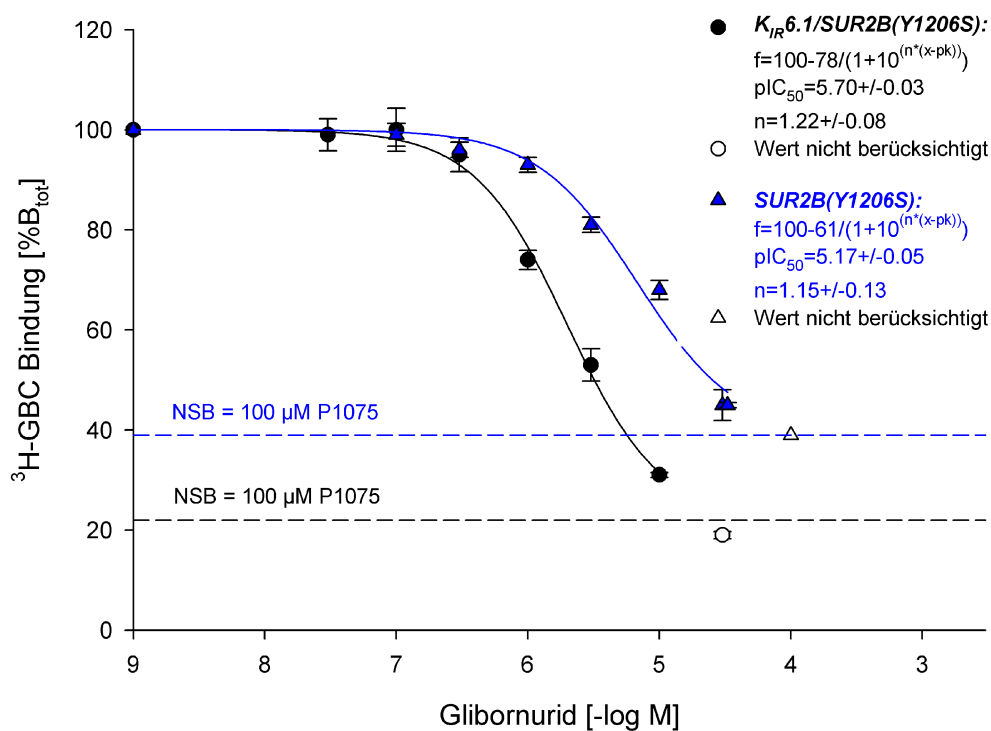


Abb. 13 Hemmung der 3H -GBC-Bindung durch Glibornurid an SUR2B(Y1206S) und an $K_{IR}6.1/SUR2B(Y1206S)$

Die Kompetitionskurven zeigen graphisch mit Hilfe von SigmaPlot eine Anpassung der Hill-Gleichung an die gemittelten Werte. Die blaue Kurve mit Dreiecken stellt die Bindung von Glibornurid an SUR2B(Y1206S) und die schwarze Kurve mit Punkten die Bindung durch Glibornurid an $K_{IR}6.1/SUR2B(Y1206S)$ bei Koexpression dar. Als Kurvengleichung diente $f=100-B_S(\%)/(1-10^{(n*(x-pIC_{50}))})$ und die Mittelpunkte der Kurven ergeben die pIC_{50} bzw. pK_i . Tabelle 7 gibt die Mittelwerte der Parameter aus den Einzelexperimenten wieder.

Für SUR2B(Y1206S) lässt sich aus den pK_i -Mittelwerten eine pK_i [-log M] von $5,31 \pm 0,09$ und eine K_i [μM] von 4,9 (Konfidenzintervall 3,2 bis 7,4 μM) errechnen.

Aus den pK_i -Mittelwerten von $K_{iR}6.1/\text{SUR2B(Y1206S)}$ wird eine pK_i [-log M] von $5,90 \pm 0,02$ bei einer K_i [μM] von 1,3 μM errechnet. Das Konfidenzintervall liegt bei 1,1 bis 1,4 μM .

Die Affinität von Glibornurid ist damit an $K_{iR}6.1/\text{SUR2B(Y1206S)}$ im Vergleich zu SUR2B(Y1206S) um den Faktor 3,8 größer.

Tab. 7 Parametertabelle (Mittelwerte der Einzelerperimente \pm SEM) der heterologen Hemmung der $^3\text{H-GBC}$ -Bindung durch Glibornurid an SUR2B(Y1206S) und $K_{iR}6.1/\text{SUR2B(Y1206S)}$, die Regressionskurven von zwei Einzelversuchen an SUR2B(Y1206S) wurden mit einem Hill-Koeffizienten von 1 in SigmaPlot gefittet (*)

Glibornurid	L_0 [nM]	NSB (% B_{tot})	B_{tot} (fmol/mg)	pIC_{50} [μM]	pK_i [-logM]	K_i [μM]	n_H	n
SUR2B(Y1206S)	$2,10 \pm$	$39 \pm$	$150 \pm$	$5,19 \pm$	$5,31 \pm$	4,9	$1,0 \pm$	3
*	0,01	4	9	0,07	0,09		0,03	
$K_{iR}6.1/$ SUR2B(Y1206S)	$1,01 \pm$	$22 \pm$	$242 \pm$	$5,71 \pm$	$5,90 \pm$	1,3	$1,1 \pm$	3
	0,03	2	48	0,01	0,02		0,09	

3.1.2.2 Heterologe Verdrängung von ^3H -GBC durch Nateglinid

Die Anzahl der Versuche an SUR2B(Y1206S)- und an $K_{IR}6.1/SUR2B(Y1206S)$ -Zellen lag jeweils bei drei ($n=3$). Die Durchführung aller Versuche erfolgte wie in 2.9.3 beschrieben.

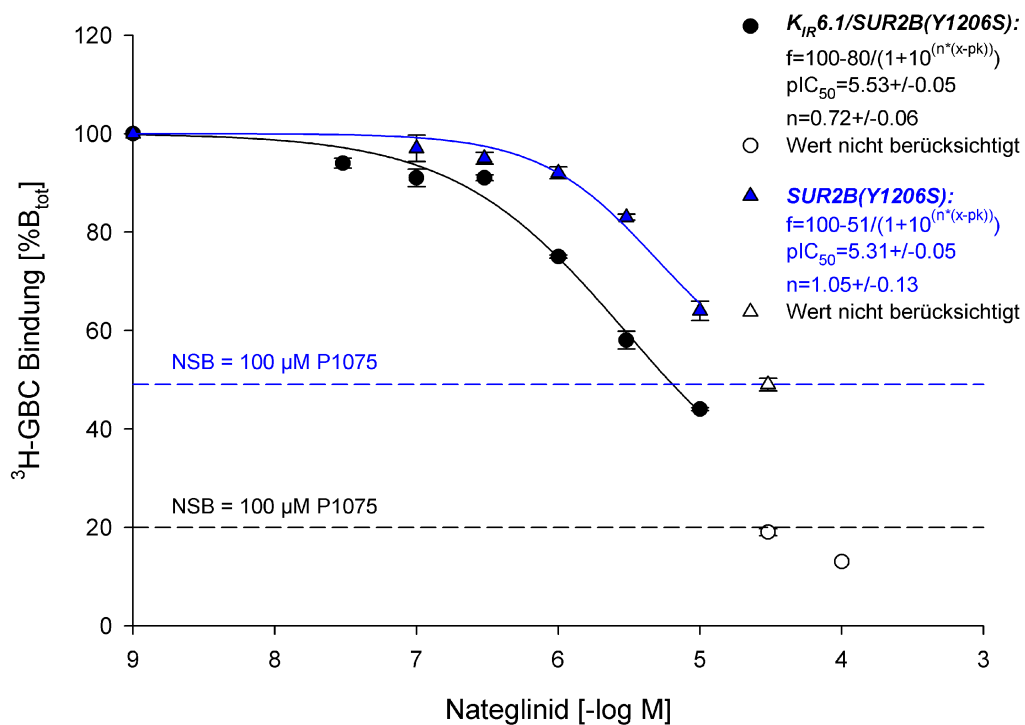


Abb. 14 Hemmung der ^3H -GBC-Bindung durch Nateglinid an SUR2B(Y1206S) und an $K_{IR}6.1/SUR2B(Y1206S)$

Die Kompetitionskurven zeigen graphisch mit Hilfe von SigmaPlot eine Anpassung der Hill-Gleichung an die gemittelten Werte. Die blaue Kurve mit Dreiecken stellt die Bindung von Nateglinid an SUR2B(Y1206S) und die schwarze Kurve mit Punkten die Bindung durch Nateglinid an $K_{IR}6.1/SUR2B(Y1206S)$ bei Koexpression dar. Als Kurvengleichung diente $f=100-B_S(\%)/(1+10^{(n*(x-pIC_{50}))})$ und die Mittelpunkte der Kurven ergeben die pIC_{50} bzw. pK_i . Tabelle 8 gibt die Mittelwerte der Parameter aus den Einzelexperimenten wieder.

Die pK_i -Mittelwerte der Experimente mit SUR2B(Y1206S) ergeben eine pK_i [-log M] von $5,43 \pm 0,08$. Daraus resultiert eine K_i [μ M] von $3,7 \mu$ M (Konfidenzintervall von $2,6$ bis $5,4 \mu$ M).

Die pK_i [-log M] von $K_{iR6.1}/SUR2B(Y1206S)$ liegt im Vergleich dazu bei $5,69 \pm 0,03$, was einer K_i [μ M] von $2,0 \mu$ M (Konfidenzintervall von $1,8$ bis $2,3 \mu$ M) entspricht.

Die Affinität von Nateglinid ist bei Koexpression an $K_{iR6.1}/SUR2B(Y1206S)$ $1,9$ Mal größer als an SUR2B(Y1206S) allein.

Tab. 8 Parametertabelle (Mittelwerte der Einzelerperimente \pm SEM) der heterologen Hemmung der 3 H-GBC-Bindung durch Nateglinid an SUR2B(Y1206S) und als Koexpression an $K_{iR6.1}/SUR2B(Y1206S)$ aus jeweils drei Einzelerperimenten, die Regressionskurven aller Einzelerperimente an SUR2B(Y1206S) wurden mit einem Hill-Koeffizienten von 1 in SigmaPlot gefittet (*)

Nateglinid	L_0 [nM]	NSB (% B_{tot})	B_{tot} (fmol/mg)	pIC_{50} [μ M]	pK_i [-logM]	K_i [μ M]	n_H	n
SUR2B(Y1206S) *	$3,29 \pm$ 0,06	$49 \pm$ 3	$230 \pm$ 11	$5,25 \pm$ 0,07	$5,43 \pm$ 0,08	3,7	$1,0 \pm$ 0,0	3
$K_{iR6.1}/$ SUR2B(Y1206S)	$0,98 \pm$ 0,02	$20 \pm$ 1	$252 \pm$ 31	$5,52 \pm$ 0,02	$5,69 \pm$ 0,03	2,0	$0,8 \pm$ 0,03	3

3.1.3 Bindung von Liganden vom Typ B an SUR2B(Y1206S) und $K_{IR}6.1/SUR2B(Y1206S)$

3.1.3.1 Heterologe Verdrängung von 3H -GBC durch Repaglinid

Die Versuche mit Repaglinid an SUR2B(Y1206S)-Zellen wurden mit 3 Versuchsreihen ($n=3$) und diejenigen mit $K_{IR}6.1/SUR2B(Y1206S)$ -Zellen mit 5 Versuchsreihen ($n=5$) durchgeführt (DNA-Verhältnis von $K_{IR}6.1$ zu SUR2B(Y1206S) bei drei Versuchen 1:1 und je ein Versuch mit 2:1 und 3:1). Die Versuchsdurchführung wurde wie in 2.9.3 durchgeführt.

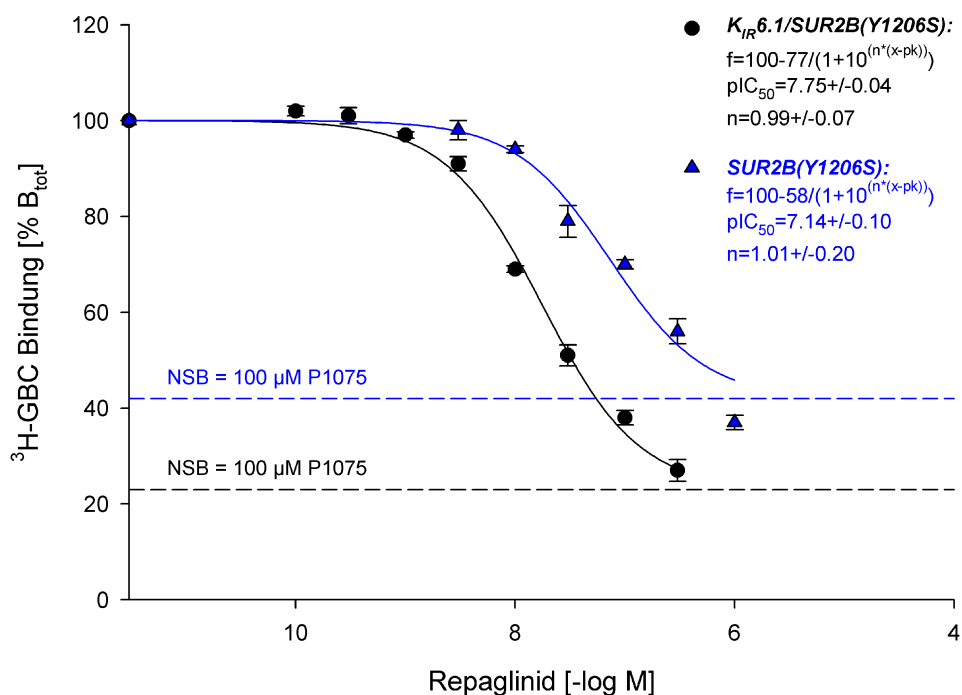


Abb. 15 Hemmung der 3H -GBC-Bindung durch Repaglinid an SUR2B(Y1206S) und an $K_{IR}6.1/SUR2B(Y1206S)$

Die Kompetitionskurven zeigen graphisch mit Hilfe von SigmaPlot eine Anpassung der Hill-Gleichung an die gemittelten Werte. Die blaue Kurve mit Dreiecken stellt die Bindung von Repaglinid an SUR2B(Y1206S) und die schwarze Kurve mit Punkten die Bindung durch Repaglinid an $K_{IR}6.1/SUR2B(Y1206S)$ bei Koexpression dar. Als Kurvengleichung diente $f=100-B_s(\%)/(1-10^{(n*(x-pIC_{50}))})$ und die Mittelpunkte der Kurven ergeben die pIC_{50} bzw. pK_i . Tabelle 9 gibt die Mittelwerte der Parameter aus den Einzelexperimenten wieder.

Für Repaglinid lässt sich aus den Mittelwerten der Versuche mit SUR2B(Y1206S) eine pK_i [-log M] von $7,30 \pm 0,06$ errechnen und für K_i [nM] resultiert danach ein Wert von 50 nM. Das Konfidenzintervall liegt zwischen 38 bis 66 nM.

Bei $K_{IR}6.1$ /SUR2B(Y1206S)-Zellen ergibt sich aus den Mittelwerten der Versuche eine pK_i [-log M] von $7,96 \pm 0,02$. Die K_i [nM] beträgt somit 11 nM bei einem Konfidenzintervall 10 bis 12 nM.

Bei Koexpression an $K_{IR}6.1$ /SUR2B(Y1206S) zeigt sich im Vergleich zu SUR2B(Y1206S) eine Steigerung der Affinität von Repaglinid um den Faktor 4,5.

Tab. 9 Parametertabelle (Mittelwerte der Einzelerperimente \pm SEM) der heterologen Hemmung der 3H -GBC-Bindung durch Repaglinid an SUR2B(Y1206S) und $K_{IR}6.1$ /SUR2B(Y1206S)

Repaglinid	L_0 [nM]	NSB (% B_{tot})	B_{tot} (fmol/mg)	pIC_{50} [nM]	pK_i [-logM]	K_i [nM]	n_H	n
SUR2B(Y1206S)	$3,14 \pm$ 0,06	$42 \pm$ 2	$239 \pm$ 11	$7,13 \pm$ 0,05	$7,30 \pm$ 0,06	50	$0,9 \pm$ 0,15	3
$K_{IR}6.1$ / SUR2B(Y1206S)	$1,01 \pm$ 0,01	$23 \pm$ 2	$220 \pm$ 13	$7,78 \pm$ 0,01	$7,96 \pm$ 0,02	11	$0,9 \pm$ 0,05	5

3.1.3.2 Heterologe Verdrängung von ^3H -GBC durch Meglitinid

Die Versuche mit Meglitinid an SUR2B(Y1206S)-Zellen wurden mit 4 Versuchsreihen (n=4) und diejenigen mit $K_{IR}6.1/\text{SUR2B}(Y1206S)$ -Zellen mit 3 Versuchsreihen (n=3) durchgeführt. Die Durchführung erfolgte wie in 2.9.3 beschrieben.

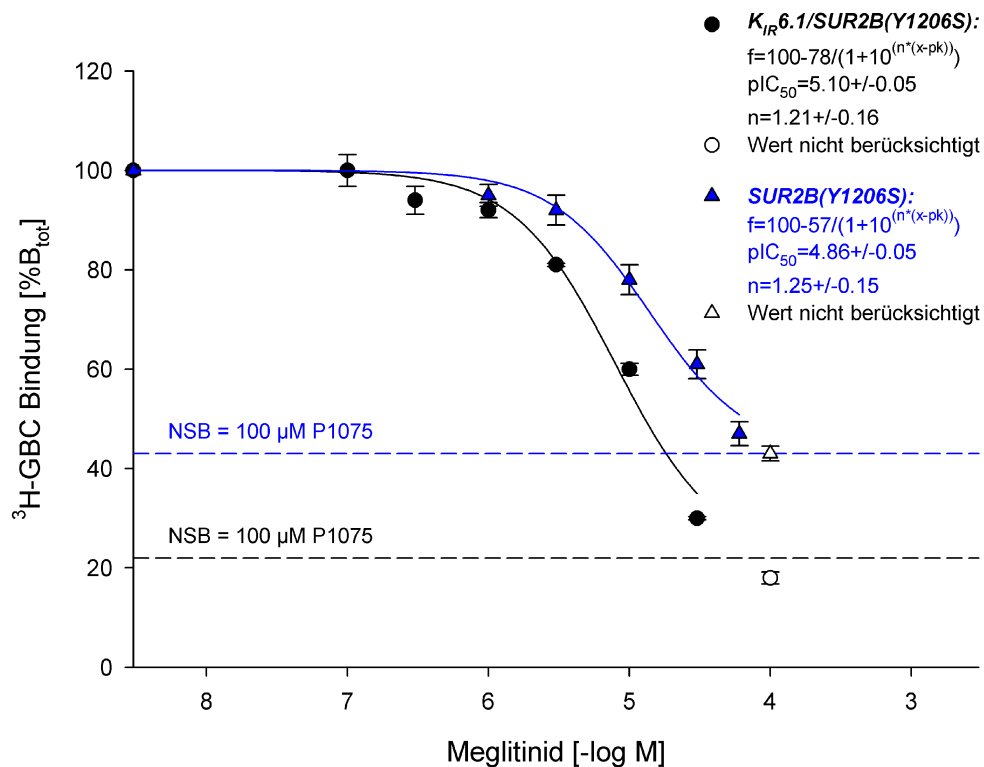


Abb. 16 Hemmung der ^3H -GBC-Bindung durch Meglitinid an SUR2B(Y1206S) und an $K_{IR}6.1/\text{SUR2B}(Y1206S)$

Die Kompetitionskurven zeigen graphisch mit Hilfe von SigmaPlot eine Anpassung der Hill-Gleichung an die gemittelten Werte. Die blaue Kurve mit Dreiecken stellt die Bindung von Meglitinid an SUR2B(Y1206S) und die schwarze Kurve mit Punkten die Bindung durch Meglitinid an $K_{IR}6.1/\text{SUR2B}(Y1206S)$ bei Koexpression dar. Als Kurvengleichung diente $f=100-B_s(\%)/(1-10^{(n*(x-pIC_{50}))})$ und die Mittelpunkte der Kurven ergeben die pIC_{50} bzw. pK_I . Tabelle 10 gibt die Mittelwerte der Parameter aus den Einzelexperimenten wieder.

Die pK_i [-log M] der Mittelwerte von Meglitinid an SUR2B(Y1206S) ergibt $5,04 \pm 0,03$ μM und es errechnet sich eine K_i [μM] von $9,1$ μM (Konfidenzintervall $7,9$ bis $10,5$ μM).

Vergleichend dazu errechnet sich aus den Mittelwerten an $K_{IR}6.1/SUR2B(Y1206S)$ eine pK_i [-log M] von $5,26 \pm 0,03$ mit resultierender K_i [μM] von $5,5$ μM (Konfidenzintervall $4,8$ bis $6,3$ μM).

Die Affinität von Meglitinid ist um den Faktor $1,7$ höher an $K_{IR}6.1/SUR2B(Y1206S)$ als an SUR2B(Y1206S).

Tab. 10 Parametertabelle (Mittelwerte der Einzelerperimente \pm SEM) der heterologen Hemmung der ^3H -GBC-Bindung durch Meglitinid an SUR2B(Y1206S) und $K_{IR}6.1/SUR2B(Y1206S)$, die Regressionskurven aller Einzelversuche an SUR2B(Y1206S) wurden mit einem Hill-Koeffizienten von 1 in SigmaPlot gefittet (*)

Meglitinid	L_0 [nM]	NSB (% B_{tot})	B_{tot} (fmol/mg)	pIC_{50} [μM]	pK_i [-logM]	K_i [μM]	n_H	n
SUR2B(Y1206S)	$2,15 \pm$	$43 \pm$	$150 \pm$	$4,92 \pm$	$5,04 \pm$	$9,1$	$1,0 \pm$	4
*	$0,2$	2	18	$0,02$	$0,03$		$0,0$	
$K_{IR}6.1/SUR2B(Y1206S)$	$1,05 \pm$	$22 \pm$	$229 \pm$	$5,07 \pm$	$5,26 \pm$	$5,5$	$1,3 \pm$	3
	$0,06$	0	20	$0,02$	$0,03$		$0,1$	

3.1.3.3 Heterologe Verdrängung von ^3H -GBC durch UL-DF 9

Die Anzahl der Versuche mit UL-DF 9 an SUR2B(Y1206S)- und an $K_{\text{IR}}6.1/\text{SUR2B}(Y1206\text{S})$ -Zellen lag jeweils bei drei Versuchen ($n=3$). Durchgeführt wurden alle Versuche wie in 2.9.3 beschrieben.

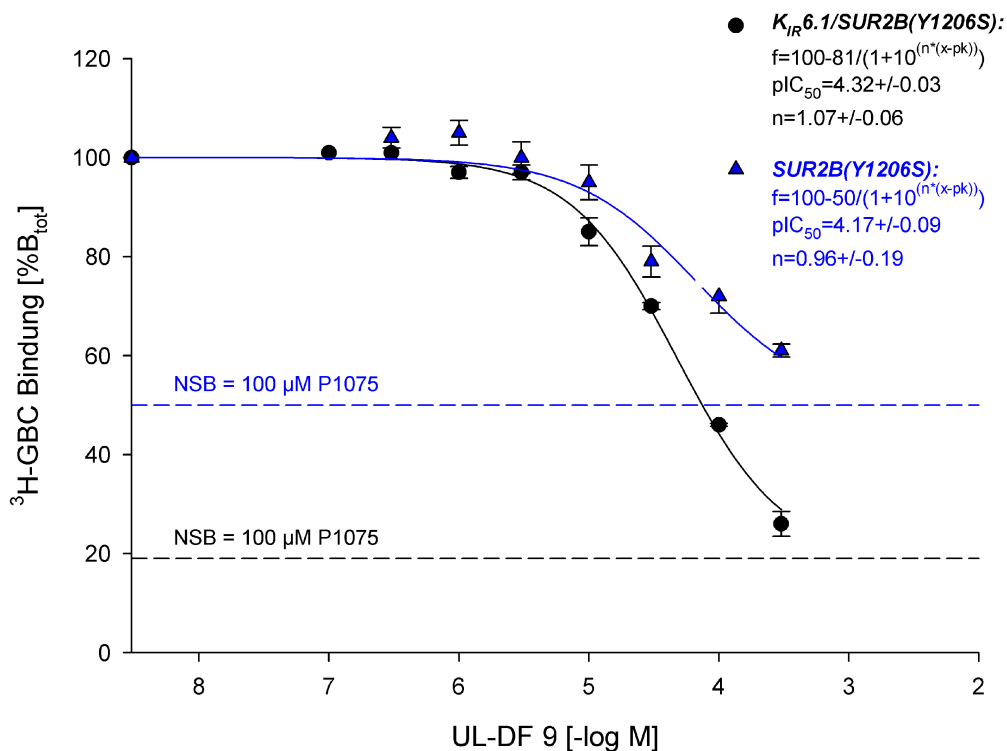


Abb. 17 Hemmung der ^3H -GBC-Bindung durch UL-DF 9 an SUR2B(Y1206S) und an $K_{\text{IR}}6.1/\text{SUR2B}(Y1206\text{S})$

Die Kompetitionskurven zeigen graphisch mit Hilfe von SigmaPlot eine Anpassung der Hill-Gleichung an die gemittelten Werte. Die blaue Kurve mit Dreiecken stellt die Bindung von UL-DF 9 an SUR2B(Y1206S) und die schwarze Kurve mit Punkten die Bindung durch UL-DF 9 an $K_{\text{IR}}6.1/\text{SUR2B}(Y1206\text{S})$ bei Koexpression dar. Als Kurvengleichung diente $f=100-B_s(\%)/(1-10^{(n*(x-\text{pIC}_{50}))})$ und die Mittelpunkte der Kurven ergeben die pIC_{50} bzw. pK_i . Tabelle 11 gibt die Mittelwerte der Parameter aus den Einzelexperimenten wieder.

Die Mittelwerte der Experimente mit UL-DF 9 an SUR2B(Y1206S) ergeben eine K_i [μM] von 24 μM bei einer $\text{p}K_i$ [-log M] von $4,62 \pm 0,06$. Das Konfidenzintervall liegt zwischen 18 bis 32 μM .

Die $\text{p}K_i$ [-log M] von $K_{iR}6.1/\text{SUR2B(Y1206S)}$ liegt im Vergleich dazu bei $4,48 \pm 0,01$ und entspricht einer K_i [μM] von 33 μM (Konfidenzintervall von 32 bis 35 μM) entspricht.

Im Gegensatz zu allen anderen Versuchsreihen findet sich bei UL-DF 9 keine Erhöhung der Affinität durch Koexpression. Es liegt sogar eine 1,4-fache Affinitätserhöhung an SUR2B(Y1206S) im Vergleich zu $K_{iR}6.1/\text{SUR2B(Y1206S)}$ vor.

Tab. 11 Parametertabelle (Mittelwerte der Einzelexperimente \pm SEM) der heterologen Hemmung der ^3H -GBC-Bindung durch UL-DF 9 an SUR2B(Y1206S) und $K_{iR}6.1/\text{SUR2B(Y1206S)}$

UL-DF 9	L_0 [nM]	NSB (% B_{tot})	B_{tot} (fmol/mg)	$\text{p}IC_{50}$ [μM]	$\text{p}K_i$ [-logM]	K_i [μM]	n_H	n
SUR2B(Y1206S)	$3,54 \pm 1,0$	50 ± 1	255 ± 7	$4,44 \pm 0,05$	$4,62 \pm 0,06$	24	$1,4 \pm 0,15$	3
$K_{iR}6.1/\text{SUR2B(Y1206S)}$	$1,04 \pm 0,02$	19 ± 1	329 ± 15	$4,30 \pm 0,01$	$4,48 \pm 0,01$	33	$1,0 \pm 0,04$	3

3.1.3.4 Heterologe Verdrängung von ^3H -GBC durch (-)-AZ-DF 265

Es erfolgten mit (-)-AZ-DF 265 sowohl an SUR2B(Y1206S)- als auch an $K_{IR}6.1$ /SUR2B(Y1206S)-Zellen jeweils 3 Versuchsreihen ($n=3$) und diese wurden jeweils wie in 2.9.3 beschrieben vorgenommen.

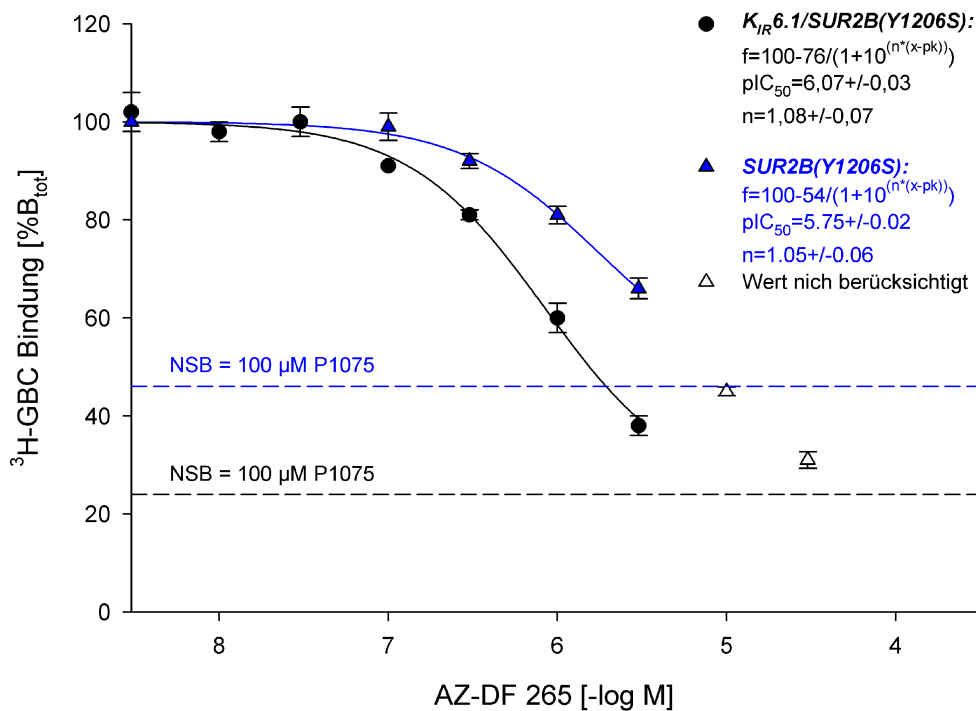


Abb. 18 Hemmung der ^3H -GBC-Bindung durch (-)-AZ-DF 265 an SUR2B(Y1206S) und an $K_{IR}6.1$ /SUR2B(Y1206S)

Die Kompetitionskurven zeigen graphisch mit Hilfe von SigmaPlot eine Anpassung der Hill-Gleichung an die gemittelten Werte. Die blaue Kurve mit Dreiecken stellt die Bindung von (-)-AZ-DF 265 an SUR2B(Y1206S) und die schwarze Kurve mit Punkten die Bindung durch (-)-AZ-DF 265 an $K_{IR}6.1$ /SUR2B(Y1206S) bei Koexpression dar. Als Kurvengleichung diente $f=100-B_s(\%)/(1-10^{(n*(x-pIC_{50}))})$ und die Mittelpunkte der Kurven ergeben die pIC_{50} bzw. pK_i . Tabelle 12 gibt die Mittelwerte der Parameter aus den Einzelexperimenten wieder.

Für SUR2B(Y1206S) lässt sich eine pK_i [-log M] von $5,89 \pm 0,06$ mit (-)-AZ-DF 265 aus den Mittelwerten errechnen. Daraus folgt eine K_i [μM] von $1,28 \mu\text{M}$ bei einem Konfidenzintervall von $0,98$ bis $1,70 \mu\text{M}$.

Die Mittelwerte mit (-)-AZ-DF 265 an $K_{iR}6.1/\text{SUR2B(Y1206S)}$ ergeben eine pK_i [-log M] von $6,26 \pm 0,03$ bei einer resultierenden K_i [μM] von $0,55 \mu\text{M}$. Das Konfidenzintervall liegt bei $0,48$ bis $0,63 \mu\text{M}$.

Die Affinität von (-)-AZ-DF 265 an $K_{iR}6.1/\text{SUR2B(Y1206S)}$ ist um den Faktor $2,3$ höher als an SUR2B(Y1206S).

Tab. 12 Parametertabelle (Mittelwerte der Einzelerperimente \pm SEM) der heterologen Hemmung der ^3H -GBC-Bindung durch (-)-AZ-DF 265 an SUR2B(Y1206S) und $K_{iR}6.1/\text{SUR2B(Y1206S)}$, das dritte Einzelerperiment wurde von Petra Kühner durchgeführt (*)

(-)-AZ-DF 265	L_0 [nM]	NSB (% B_{tot})	B_{tot} (fmol/mg)	pIC_{50} [μM]	pK_i [-logM]	K_i [μM]	n_H	n
SUR2B(Y1206S)	$2,67 \pm 0,2$	46 ± 1	167 ± 12	$5,75 \pm 0,04$	$5,89 \pm 0,06$	1,28	$1,0 \pm 0,06$	3
$K_{iR}6.1/\text{SUR2B(Y1206S)}$ *	$1,08 \pm 0,05$	24 ± 2	217 ± 22	$6,07 \pm 0,04$	$6,26 \pm 0,03$	0,55	$1,2 \pm 0,03$	3

3.2 Bindung von Sulfonylharnstoffen und Gliniden an SUR2B(Y1206S) und $K_{IR}6.2/SUR2B(Y1206S)$

In einer zweiten kürzeren Serie von Versuchsreihen wurde der Effekt der Koexpression mit $K_{IR}6.2$ auf die Bindung von Sulfonylharnstoffen (Glibenclamid) und Gliniden (Repaglinid) an SUR2B(Y1206S) untersucht.

3.2.1 Bindung von langkettigen Sulfonylharnstoffen (Liganden vom Typ A+B) an SUR2B(Y1206S) und $K_{IR}6.2/SUR2B(Y1206S)$

3.2.1.1 Homologe Verdrängung von 3H -GBC durch GBC

Die Experimente der homologen Verdrängung 3H -GBC durch GBC wurden mit jeweils drei Versuchsreihen ($n=3$) an SUR2B(Y1206S)- und $K_{IR}6.2/SUR2B(Y1206S)$ -Zellen, wie in 2.9.3 erklärt, durchgeführt.

Aus den Mittelwerten der Versuche mit GBC an SUR2B(Y1206S) errechnete sich eine K_D [nM] von 6,6 nM (Konfidenzintervall von 5,0 bis 8,7 nM) bei einer pK_D [-log M] von $8,18 \pm 0,06$ (s.3.1.1.1).

An $K_{IR}6.2/SUR2B(Y1206S)$ findet sich anhand der Mittelwerte eine K_D [nM] von 1,1 nM (Konfidenzintervall 0,8 bis 1,5 nM). Die pK_D [-log M] liegt bei $8,96 \pm 0,07$. Bei Koexpression an $K_{IR}6.2/SUR2B(Y1206S)$ steigert sich die Affinität von GBC im Vergleich zu SUR2B(Y1206S) um den Faktor 6.

Vergleicht man nun die Koexpressionen an $K_{IR}6.2/SUR2B(Y1206S)$ und $K_{IR}6.1/SUR2B(Y1206S)$ kann eine weitere Erhöhung der Affinität um den Faktor 1,7 (K_D von 1,1 nM an $K_{IR}6.2/SUR2B(Y1206S)$ zu K_D von 1,9 nM an $K_{IR}6.1/SUR2B(Y1206S)$) festgestellt werden.

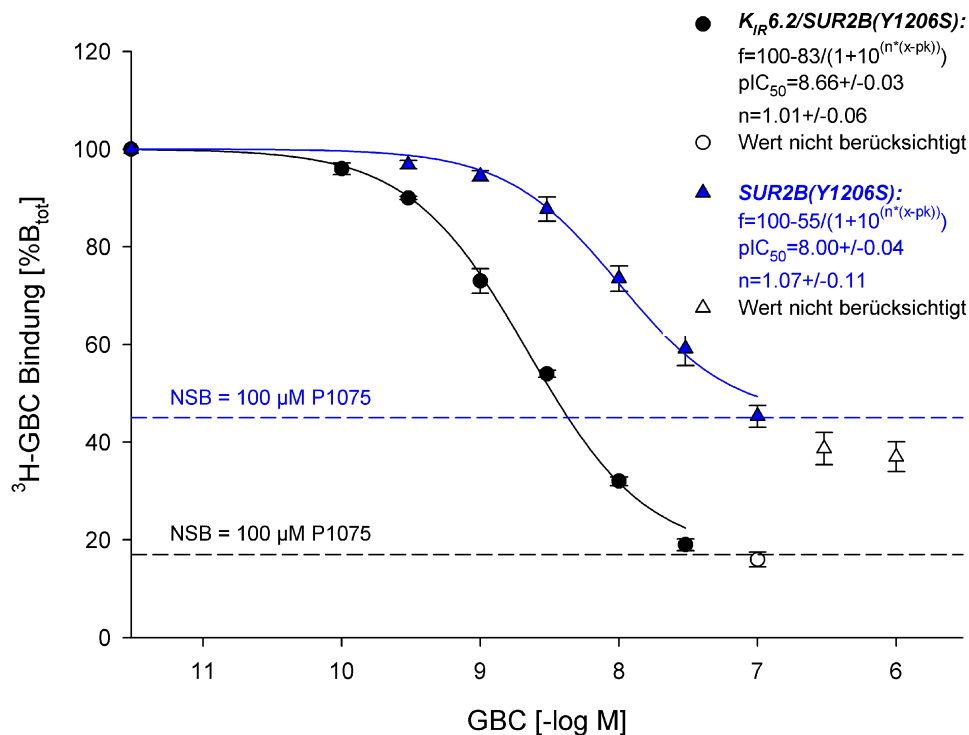


Abb. 19 Hemmung der 3H -GBC-Bindung durch GBC an SUR2B(Y1206S) und an $K_{IR}6.2/SUR2B(Y1206S)$

Die Kompetitionskurven zeigen graphisch mit Hilfe von SigmaPlot eine Anpassung der Hill-Gleichung an die gemittelten Werte. Die blaue Kurve mit Dreiecken stellt die Bindung von GBC an SUR2B(Y1206S) und die schwarze Kurve mit Punkten die Bindung durch GBC an $K_{IR}6.2/SUR2B(Y1206S)$ bei Koexpression dar. Als Kurvengleichung diente $f=100-B_s(\%)/(1-10^{(n*(x-pIC_{50}))})$ und die Mittelpunkte der Kurven ergeben die pIC_{50} bzw. pK_D . Tabelle 13 gibt die Mittelwerte der Parameter aus den Einzelexperimenten wieder.

Tab. 13 Parametertabelle (Mittelwerte der Einzelexperimente \pm SEM) der homologen Hemmung der 3H -GBC-Bindung durch GBC an SUR2B(Y1206S) und $K_{IR}6.2/SUR2B(Y1206S)$

GBC	L_0 [nM]	NSB (% B_{tot})	B_{tot} (fmol/mg)	pIC_{50} [nM]	pK_D [-logM]	K_D [nM]	n_H	n
SUR2B(Y1206S)	$3,10 \pm 0,10$	44 ± 3	367 ± 90	$8,01 \pm 0,04$	$8,18 \pm 0,06$	6,6	$1,1 \pm 0,04$	3
$K_{IR}6.2/SUR2B(Y1206S)$	$1,07 \pm 0,01$	17 ± 1	340 ± 44	$8,66 \pm 0,02$	$8,96 \pm 0,07$	1,1	$1,0 \pm 0,03$	3

3.2.2 Bindung von Liganden vom Typ B an SUR2B(Y1206S) und $K_{IR}6.2/SUR2B(Y1206S)$

3.2.2.1 Heterologe Verdrängung von 3H -GBC durch Repaglinid

Die Versuchsreihen mit Repaglinid an SUR2B(Y1206S)- und $K_{IR}6.2/SUR2B(Y1206S)$ -Zellen wurden beide mit je drei Einzelerperimenten ($n=3$) und wie unter 2.9.3 beschrieben durchgeführt.

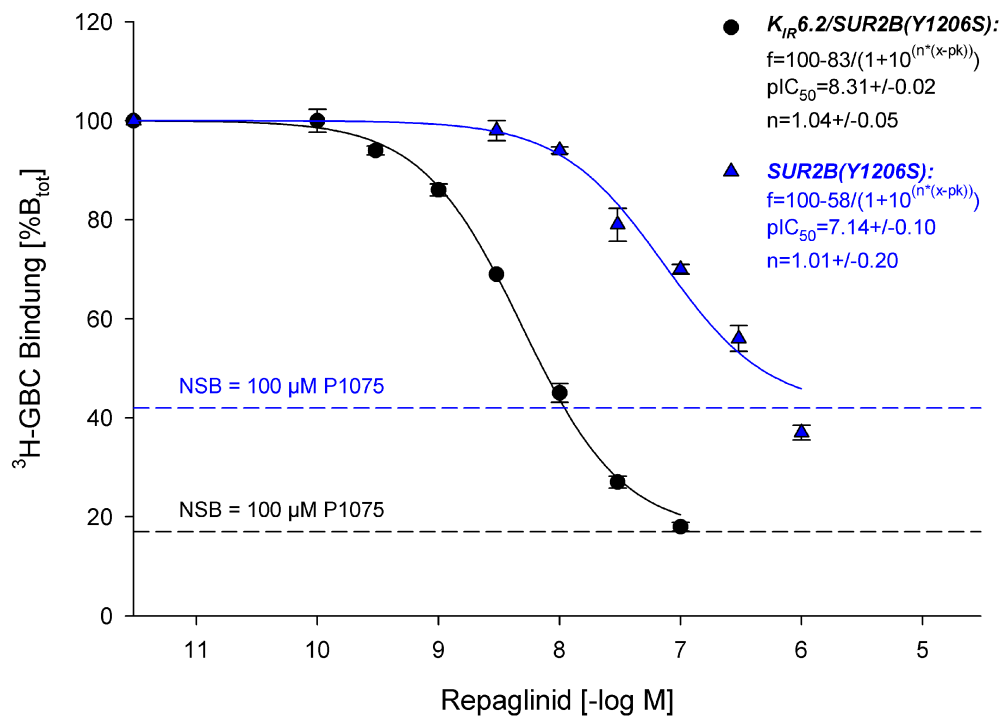


Abb. 20 Hemmung der 3H -GBC-Bindung durch Repaglinid an SUR2B(Y1206S) und an $K_{IR}6.2/SUR2B(Y1206S)$

Die Kompetitionskurven zeigen graphisch mit Hilfe von SigmaPlot eine Anpassung der Hill-Gleichung an die gemittelten Werte. Die blaue Kurve mit Dreiecken stellt die Bindung von Repaglinid an SUR2B(Y1206S) und die schwarze Kurve mit Punkten die Bindung durch Repaglinid an $K_{IR}6.2/SUR2B(Y1206S)$ bei Koexpression dar. Als Kurvengleichung diente $f=100-B_S(\%)/(1-10^{(n \cdot (x-pIC_{50}))})$ und die Mittelpunkte der Kurven ergeben die pIC_{50} bzw. pK_i . Tabelle 14 gibt die Mittelwerte der Parameter aus den Einzelerperimenten wieder.

An SUR2B(Y1206S) ergibt sich mit Repaglinid aus den Mittelwerten eine pK_i [-log M] von $7,30 \pm 0,06$ und eine K_i [nM] von 50 nM. Das Konfidenzintervall liegt zwischen 38 bis 66 nM.

Im Vergleich hierzu befinden sich an $K_{IR}6.2/SUR2B(Y1206S)$ die pK_i [-log M] bei $8,59 \pm 0,02$ und die K_i [nM] bei 2,6, wobei das Konfidenzintervall zwischen 2,3 bis 2,8 nM liegt.

Die Affinität von Repaglinid an $K_{IR}6.2/SUR2B(Y1206S)$ ist um den Faktor 19,2 größer als an SUR2B(Y1206S) allein. Im Vergleich der Koexpressionen zeigt sich eine Affinitätserhöhung von Repaglinid an $K_{IR}6.2/SUR2B(Y1206S)$ zu $K_{IR}6.1/SUR2B(Y1206S)$ um den Faktor 4,2 (K_i von 2,6 nM an $K_{IR}6.2/SUR2B(Y1206S)$ zu K_i von 11 nM an $K_{IR}6.1/SUR2B(Y1206S)$)).

Tab. 14 Parametertabelle (Mittelwerte der Einzelerperimente \pm SEM) der heterologen Hemmung der 3H -GBC-Bindung durch Repaglinid an SUR2B(Y1206S) und $K_{IR}6.2/SUR2B(Y1206S)$

Repaglinid	L_0 [nM]	NSB (% B_{tot})	B_{tot} (fmol/mg)	pIC_{50} [nM]	pK_i [-logM]	K_i [nM]	n_H	n
SUR2B(Y1206S)	$3,14 \pm$ 0,06	$42 \pm$ 2	$239 \pm$ 11	$7,13 \pm$ 0,05	$7,30 \pm$ 0,06	50	$0,9 \pm$ 0,15	3
$K_{IR}6.2/$ SUR2B(Y1206S)	$1,04 \pm$ 0,03	$17 \pm$ 1	$368 \pm$ 22	$8,30 \pm$ 0,01	$8,59 \pm$ 0,02	2,6	$1,0 \pm$ 0,04	3

4 DISKUSSION

Sulfonylharnstoffe und Glinide binden an die regulatorische Untereinheit der K_{ATP} -Kanäle, die Sulfonylharnstoffrezeptoren (SURs), und haben pharmakologisch ihren Platz in der oralen Behandlung des nichtinsulinabhängigen Diabetes mellitus Typ 2. Das Wirkprinzip beruht auf der Inhibition der Kaliumkanalaktivität, wodurch es zu einer Steigerung der Insulinsekretion in β -Zellen des Pankreas ($K_{IR}6.2/SUR1$) kommt.

Im menschlichen Körper finden sich jedoch neben dem pankreatischen und neuronalen Kanaltyp ($K_{IR}6.2/SUR1$) noch weitere K_{ATP} -Kanäle. Vor allem den kardiovaskulären Subtypen, $K_{IR}6.2/SUR2A$ (Herz und Skelettmuskel) und $K_{IR}6.1/SUR2B$ (Gefäße), kommt in dieser Hinsicht eine besondere Bedeutung zu (s. 1.2.3 und 1.2.4). Diese sind relativ unempfindlich gegenüber Sulfonylharnstoffen und Gliniden. In der Bindungsaffinität unterscheiden sich K_{ATP} -Kanäle wie folgt: $K_{IR}6.2/SUR1$ bindet Sulfonylharnstoffe und Glinide im Vergleich zu $K_{IR}6.1/SUR2B$ ~76-fach und im Vergleich zu $K_{IR}6.2/SUR2A$ ~19-fach (s. Tab. 17) besser.

Für die Abschätzung des Nebenwirkungspotentials kommt es allerdings auf die Potenz der Substanz beim Schließen des Kanals an. In die Potenz (gegeben durch die EC_{50} des Kanalblocks) gehen die Affinität der Bindung (gegeben durch den K_D -Wert) und die Transduktion der Inhibitor-Bindung in den Kanalblock ein. Affinität und Potenz liegen oft weit auseinander. Experimente in unserer Gruppe haben gezeigt, dass der Kanalblock an $K_{IR}6.2/SUR1$ dabei durch Glibenclamid (Repaglinid) ca. 1000-fach (100- bzw. 30-fach) wirksamer ist als an $K_{IR}6.1/SUR2B$ und an $K_{IR}6.2/SUR2A$ (167;189). Hinzu kommt, dass die Hemmung des pankreatischen Kanals durch Glibenclamid bzw. Repaglinid vollständig und sehr lang andauernd ("irreversibel"), die der kardiovaskulären Kanäle jedoch unvollständig und relativ rasch reversibel ist (189). Im Gegensatz hierzu zeigten Studien von Dabrowski et al. (2001) mit Repaglinid keinen Unterschied in der Potenz des Kanalblocks an pankreatischen und kardiovaskulären K_{ATP} -Kanälen (49).

A-Liganden wie Nateglinid zeigen in der Kanalhemmung sehr starke Selektivität für den pankreatischen Kanal, die ebenfalls weit größer ist als von den Bindungsaffinitäten her vermutet (82;32;208).

Die Bindungsstudien und elektrophysiologischen Studien an pankreatischen und kardiovaskulären K_{ATP} -Kanälen zeigen zusammengenommen kein einheitliches Bild hinsichtlich der Potenz und Selektivität der Sulfonylharnstoffe und Glinide. In klinischen Studien scheinen bei widersprüchlichen Ergebnissen ebenfalls Zweifel an der therapeutischen Sicherheit der Sulfonylharnstoffe und Glinide zu bestehen (s.1.4).

Diese Arbeit beschäftigt sich ausschließlich mit der Mutante der regulatorischen Untereinheit SUR2B(Y1206S) des K_{ATP} -Kanals, die als Wildtyp hauptsächlich in der glatten Muskulatur der Gefäße ($K_{IR}6.1/SUR2B$) exprimiert wird. Sie beantwortet die Frage der Affinität ausgewählter K_{ATP} -Kanal-Inhibitoren zu SUR2B(Y1206S) allein und nach Koexpression mit $K_{IR}6.1$ ebenso wie die Frage der Bindungsselektivität an die K_{ATP} -Kanal-Subtypen.

Die Mutante $K_{IR}6.1/SUR2B(Y1206S)$ wurde dem Wildtyp vorgezogen, da der Kanal $K_{IR}6.1/SUR2B$ eine geringe Bindungsaffinität gegenüber Glibenclamid ($K_D \sim 30$ nM) und anderen Sulfonylharnstoffen besitzt (167). Hieraus resultiert eine hohe unspezifische Bindung bei den Bindungsexperimenten und präzise Messungen sind kaum möglich. Ein Austausch der Aminosäure Tyrosin an Position 1206 durch Serin (muriner K_{ATP} -Kanal) erhöht die Affinität der Sulfonylharnstoffe (A- und A+B-Liganden) gegenüber SUR2 und auch in der Koexpression signifikant um den Faktor 7-20 (s.1.3.1) (75;188;208). Es lassen sich durch die Mutanten SUR2A/B(Y1206S) daher präzisere Bindungsanalysen durchführen und durch die Mutanten kann die Interpretation der Ergebnisse verbessert werden. Für die B-Liganden gilt eine differenzierte Betrachtung. Die Liganden Meglitinid und UL-DF 9 ähneln in ihrem Verhalten den A- und A+B-Liganden, jedoch mit einer geringeren Ausprägung des Koexpressionseffektes (Faktor 3,5 und 7,1). Nur die Piperidino-Verbindungen zeigen keine Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutante.

4.1 Effekte der Koexpression von SUR2B(Y1206S) mit K_{IR}6.1

Im folgenden werden die Ergebnisse der Versuche mit SUR2B(Y1206S) im Vergleich zu den Versuchen der Koexpression K_{IR}6.1/SUR2B(Y1206S) an intakten HEK-Zellen mit den verschiedenen Ligandentypen (A/B/A+B) tabellarisch (s. Tab. 15) dargestellt (s. Kapitel 3). Alle Ergebnisse bis auf die Versuche mit den Liganden Glimpirid und Gliquidon (SUR2B(Y1206S) und K_{IR}6.1/SUR2B(Y1206S)) sowie AZ-DF 265 und Gliclazid (K_{IR}6.1/SUR2B(Y1206S)), deren Durchführung von der Arbeitsgruppe um Prof. U. Quast erfolgte, wurden von mir selbst experimentell ermittelt.

Tab. 15 Effekte der Koexpression mit K_{IR}6.1 auf die Affinität von SUR2B(Y1206S) für Sulfonylharnstoffe und Glinide (Ligandentypen) in -logM. Der pK_I-Wert ± SEM wurde als Mittelwert aus drei bis fünf Einzelexperimenten ermittelt.

Nr.	Sulfonylharnstoffe/ Glinide	Ligandentyp	pK _I SUR2B(Y1206S)	pK _I K _{IR} 6.1/ SUR2B(Y1206S)
1	Glibenclamid	A + B	8,18 ± 0,05	8,75 ± 0,08
2	Glimpirid	A + B	7,93 ± 0,05	8,73 ± 0,01
3	Gliquidon	A + B	7,25 ± 0,03	7,52 ± 0,07
4	Glibornurid	A	5,31 ± 0,09	5,90 ± 0,02
5	Nateglinid	A	5,43 ± 0,08	5,69 ± 0,03
6	Gliclazid	A	5,31 ± 0,02	5,76 ± 0,06
7	Repaglinid	B	7,30 ± 0,06	7,95 ± 0,01
8	AZ-DF 265	B	5,89 ± 0,06	6,26 ± 0,03
9	Meglitinid	B	5,04 ± 0,03	5,25 ± 0,02
10	UL-DF 9	B	4,62 ± 0,05	4,48 ± 0,01

Unterwirft man den Effekt der Koexpression von SUR2B(Y1206S) mit K_{IR}6.1 auf die Affinität des SUR für die Liganden einer Korrelationsanalyse (s. Abb. 21), so wird ersichtlich, dass eine signifikante Erhöhung der Affinität gegenüber Sulfonylharnstoffen und Gliniden bei Koexpression um den Faktor 2,6 (s. Tab. 17)

vorliegt. Alle pK_I -Werte liegen auf einer Geraden der Steigung 1 mit einer Distanz (d) zur Identitätslinie (Ursprungsgerade mit der Steigung 1, $y = x$) von 0,41 mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,98. Nur der pK_I -Wert von UL-DF 9 liegt im Bereich der Identitätslinie und zeigt somit keinen Effekt der Koexpression.

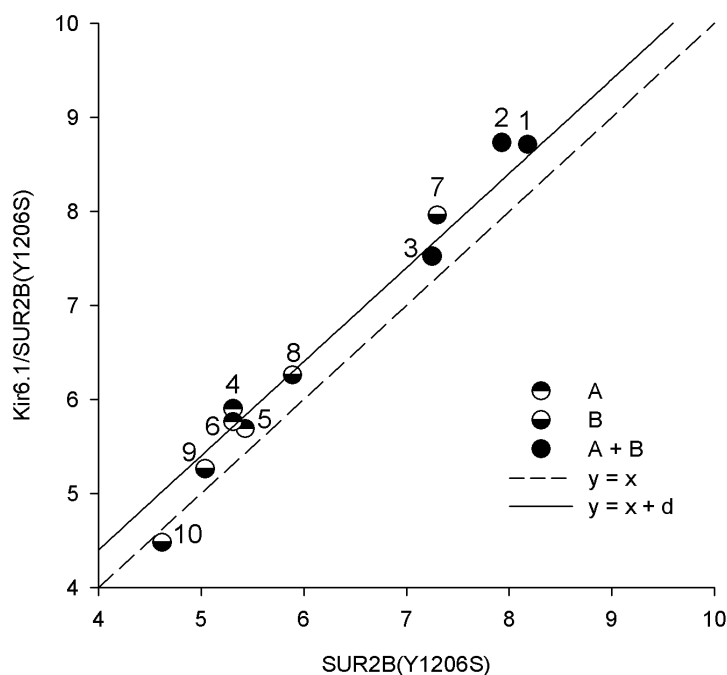


Abb. 21 Korrelationsanalyse, die den Effekt der Koexpression für Sulfonylharnstoffe und Glinide von SUR2B(Y1206S) auf $K_{IR}6.1/SUR2B(Y1206S)$ darstellt. pK_I -Werte und Nummern der Sulfonylharnstoffe und Glinide werden in Tab. 15 aufgeführt, sowie die Resultate der Korrelationsanalyse in Tab. 17. Die gestrichelte Linie beschreibt die Identitätslinie, die durchgehende Linie den besten Fit mit der Steigung 1 und die Kreise die einzelnen Sulfonylharnstoffe und Glinide und deren Ligandentyp (A/B/A+B).

Vergleicht man diese Werte mit den Effekten der Koexpression von $K_{IR}6.2/SUR2A(Y1206S)$ und $K_{IR}6.2/SUR1$ sind deutliche Unterschiede ersichtlich (189;208).

$K_{IR}6.2/SUR1$ zeigt bei A- und A+B-Liganden in Koexpression nur eine gering erhöhte Affinität gegenüber SUR1 allein (Faktor 3,3). Der Koexpressionseffekt der Piperidino-Verbindungen ist dagegen deutlich stärker und steigert die Affinität auf

den Faktor ~220. Der Kanal $K_{IR}6.2/SUR2A(Y1206S)$ ähnelt $K_{IR}6.2/SUR1$, denn die Koexpression bewirkt eine Erhöhung der Affinität der Liganden A und A+B um den Faktor 6,8. Auch hier nehmen die Piperidino-Verbindungen eine Sonderstellung ein und erhöhen die Affinität bei Koexpression um den Faktor 33. Die B-Liganden Meglitinid und UL-DF 9 weisen ein nahezu gleiches Bindungsverhalten wie die A- und A+B-Liganden auf (208).

Zusammenfassend kann man sagen, dass bei $K_{IR}6.1/SUR2B(Y1206S)$ (vaskulär) der Effekt der Koexpression für die Liganden A und A+B in vergleichbarem Maße nachgewiesen werden wie bei $K_{IR}6.2/SUR2A(Y1206S)$ (Herz) und $K_{IR}6.2/SUR1$ (Pankreas). Das für den SUR1 aufgestellte Modell der zwei Bindungstaschen A und B trifft somit auch für $K_{IR}6.1/SUR2B(Y1206S)$ zu (205;208). Die A- und B-Taschen scheinen sich demnach zu überlappen und den zentralen hydrophoben Phenylring sowie einen benachbarten negativen Ladungsträger, die gemeinsame Struktur der Sulfonylharnstoffe und Glinide, zu umgeben. Alternativ ist eine allosterische Beeinflussung oder die Bildung eines strukturellen Anteils der Bindungsregion durch den N-terminus von $K_{IR}6.x$ denkbar.

Die Sonderstellung der Piperidino-Verbindungen (Repaglinid, AZ-DF 265) mit stark erhöhter Selektivität bei Koexpression konnte jedoch bei $K_{IR}6.1/SUR2B(Y1206S)$ nicht gefunden werden. Da zwischen $SUR2A(Y1206S)$ und $SUR2B(Y1206S)$ kein Affinitätsunterschied in der Bindung von Sulfonylharnstoffen und Gliniden gezeigt werden konnte (208), kann folglich davon ausgegangen werden, dass der Unterschied durch den Einfluss der Untereinheit $K_{IR}6.x$ zustande kommen muss. $K_{IR}6.2$ bindet wirksamer an die SUR2-Untereinheit als $K_{IR}6.1$ und dieser Unterschied (s. 4.2) wird vor allem bei den Piperidino-Verbindungen deutlich.

Die unterschiedliche Selektivität der B-Liganden, die auch in dieser Arbeit zu sehen ist, lässt darauf schließen, dass innerhalb der B-Tasche zwei unterschiedliche Kompartimente zu finden sind. Ein Bereich der von allen A+B- und B-Liganden gebunden wird und einen speziellen der nur von den Piperidino-Verbindungen besetzt wird.

4.2 Unterschiede in der Bindung von Sulfonylharnstoffen und Gliniden an die K_{ATP} -Kanal-subtypen und deren Bedeutung für unerwünschte kardiovaskuläre Arzneimittelwirkungen

Sulfonylharnstoffe und Glinide stehen als medikamentöse Therapie des nichtinsulinabhängigen Diabetes mellitus Typ 2 heute weit verbreitet zur Verfügung. Da der Hauptangriffsort der Pharmaka am K_{ATP} -Kanal $K_{IR}6.2/SUR1$ liegt, besteht schon seit langem die kontroverse Diskussion, dass unerwünschte Arzneimittelwirkungen durch wenig selektive insulinotrope Substanzen an anderen K_{ATP} -Kanalsubtypen hervorgerufen werden könnten. Die Grundlage hierfür lieferten einige widersprüchliche klinische Studien und Experimente (s. 1.4) (1;128;190;184). Somit wurde die Sicherheit der klinisch eingesetzten Sulfonylharnstoffe und Glinide in Frage gestellt. Als ein wichtiger Parameter hat sich die Selektivität an den verschiedenen SURs bewährt und deren Untersuchung wurde von der Arbeitsgruppe um Prof. Quast vorangetrieben (156;189;208).

Wie schon in den einleitenden Bemerkungen der Diskussion bemerkt (s. Kapitel 4), ist die Möglichkeit kardiovaskulärer Wirkungen bestimmt durch die Selektivität des Kanalblocks (gegeben durch die unterschiedliche Potenz in der Hemmung der Kanalsubtypen). In die Potenz gehen die Bindungsaffinität und die Umsetzung der Bindung in das Schließen des Kanals (Transduktion) ein. Beides sind Subtypen-spezifische Schritte.

Für Glibenclamid, Repaglinid und Typ A Liganden wie Nateglinid oder Gliclazid fallen die Differenzen der Bindungsaffinität insgesamt kleiner als die Differenzen der Potenz aus (82;32;189;208). Hier wird die Bindung an die glattmuskuläre Mutante $K_{IR}6.1/SUR2B(Y1206S)$ mit dem pankreatischen K_{ATP} -Kanal $K_{IR}6.2/SUR1$ sowie der myokardialen K_{ATP} -Kanal-Mutante $K_{IR}6.2/SUR2A(Y1206S)$ und den Wildtypen ($K_{IR}6.1/SUR2B$ und $K_{IR}6.2/SUR2A$) verglichen. Die Ergebnisse für die Kanaltypen $K_{IR}6.2/SUR1$ und $K_{IR}6.1/SUR2A(Y1206S)$, die für die nachfolgenden vergleichenden Ausführungen benötigt werden, wurden von der Arbeitsgruppe um Prof. U. Quast ermittelt (s. Tab. 16). Das Einbringen der Mutation Y1206S in SUR2 wirkt sich zudem unterschiedlich auf die Affinität von Sulfonylharnstoffen

und Gliniden aus und der Rückschluss auf die Selektivität der Substanzen ist daher begrenzt und es muss für die Liganden differenziert werden (s.o.).

$K_{IR}6.2/SUR1$ bindet Sulfonylharnstoffe und Glinide im Durchschnitt 4,6-mal besser als $K_{IR}6.1/SUR2B(Y1206S)$. In Bezug auf die Identitätslinie ($y = x$) zeigt sich somit in der Korrelationsanalyse eine deutliche Rechtsverschiebung ($d = -0,66$; s. Abb. 22). Die A- und A+B-Liganden liegen gleichmäßig wie bei der Koexpression mit $SUR2B(Y1206S)$ (s. 4.1) auf einer Geraden. Das Bild der B-Liganden gestaltet sich uneinheitlich, denn UL-DF 9 und Meglitinid zeigen fast keinen Affinitätsunterschied im Vergleich der Kanäle. Die Piperidino-Verbindungen Repaglinid und v.a. AZ-DF 265 binden $K_{IR}6.2/SUR1$ 15- bzw. 148-fach besser als $K_{IR}6.1/SUR2B(Y1206S)$. Dies bestätigt ebenfalls die in Kapitel 4.1 beschriebene Hypothese der zwei Subkompartimente der B-Tasche und den Einfluss von $K_{IR}6.x$ auf die Affinität der Piperidino-Verbindungen.

Tab. 16 Vergleich der Affinität für Sulfonylharnstoffe und Glinide (Ligandentypen) an den unterschiedlichen K_{ATP} -Kanalsubtypen $K_{IR}6.1/SUR2B(Y1206S)$, $K_{IR}6.2/SUR1$ und $K_{IR}6.2/SUR2A(Y1206S)$ in $-\log M$. Der pK_i -Wert \pm SEM wurde als Mittelwert aus drei bis fünf Einzelexperimenten ermittelt.

Nr.	Sulfonylharnstoffe/ Glinide	Ligandentyp	pK_i $K_{IR}6.1/SUR2B(Y1206S)$	pK_i $K_{IR}6.2/SUR1$	pK_i $K_{IR}6.2/SUR2A(Y1206S)$
1	Glibenclamid	A + B	8,75 \pm 0,08	9,35 \pm 0,08	9,28 \pm 0,06
2	Glimepirid	A + B	8,73 \pm 0,01	9,24 \pm 0,02	9,16 \pm 0,05
3	Gliquidon	A + B	7,52 \pm 0,07	8,51 \pm 0,05	8,19 \pm 0,02
4	Glibornurid	A	5,90 \pm 0,02	6,44 \pm 0,02	6,28 \pm 0,04
5	Nateglinid	A	5,69 \pm 0,03	6,46 \pm 0,01	6,04 \pm 0,02
6	Gliclazid	A	5,76 \pm 0,06	6,16 \pm 0,06	6,20 \pm 0,07
7	Repaglinid	B	7,95 \pm 0,01	9,14 \pm 0,04	9,08 \pm 0,02
8	AZ-DF 265	B	6,26 \pm 0,03	8,43 \pm 0,06	7,37 \pm 0,05
9	Meglitinid	B	5,25 \pm 0,02	5,50 \pm 0,03	5,53 \pm 0,05
10	UL-DF 9	B	4,48 \pm 0,01	4,38 \pm 0,01	4,67 \pm 0,05

Erweitert man nun den Vergleich mit $K_{IR}6.2/SUR1$ auf den Wildtyp $K_{IR}6.1/SUR2B$ so wird deutlich, dass die Affinität um das 19-fache in Bezug auf A- und A+B-Liganden gegenüber der Mutante gemindert wird (s. Tab. 17). B-Liganden werden in ihrer Affinität durch die Mutation kaum beeinflusst (208).

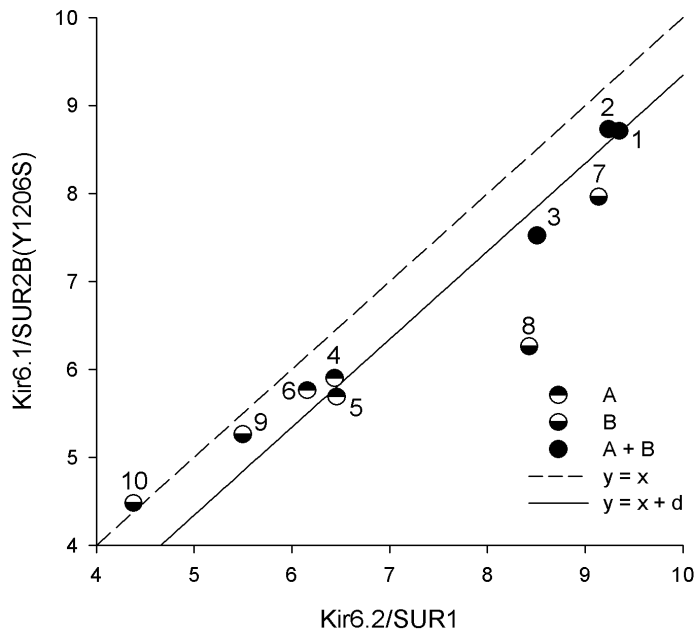


Abb. 22 Korrelationsanalyse, die den Vergleich der Bindung von Sulfonylharnstoffen und Gliniden am pankreatischen $K_{IR}6.2/SUR1$ und an der glattmuskulären Mutante $K_{IR}6.1/SUR2B(Y1206S)$ darstellt. pK_i -Werte und Nummern der Sulfonylharnstoffe und Glinide werden in Tab. 16 aufgeführt, sowie die Resultate der Korrelationsanalyse in Tab. 17. Die gestrichelte Linie beschreibt die Identitätslinie, die durchgehende Linie den besten Fit mit der Steigung 1 (AZ-DF 265 und UL-DF 9 wurden nicht berücksichtigt) und die Kreise die einzelnen Sulfonylharnstoffe und Glinide und deren Ligandentyp (A/B/A+B).

Der Vergleich der Selektivität von $K_{IR}6.1/SUR2B(Y1206S)$ mit $K_{IR}6.2/SUR2A(Y1206S)$ ist dem Vergleich von $K_{IR}6.1/SUR2B(Y1206S)$ mit $K_{IR}6.2/SUR1$ sehr ähnlich (s. Abb. 23) und unterscheidet sich auch bezüglich der Wildtypen kaum (Faktor 2,6 gegenüber 6,2).

Auch hier zeigen die A- und A+B-Liganden eine Selektivität zugunsten des $K_{IR}6.2$ -haltigen Kanals. Die Differenz (d) beträgt jedoch nur 0,41 (0,79 Wildtypen

$K_{IR}6.1/SUR2B$ gegen $K_{IR}6.2/SUR2A$) mit einem Faktor von 2,6 (s. Tab. 17). Die B-Liganden zeigen wieder die bereits bekannte Heterogenität in ihrer Affinität, d.h. Meglitinid und UL-DF 9 verhalten sich hinsichtlich der Affinität wie A-/A+B-Liganden im Vergleich der K_{ATP} -Kanäle und Repaglinid und AZ-DF 265 binden signifikant besser an $K_{IR}6.2$ (~ Faktor 13).

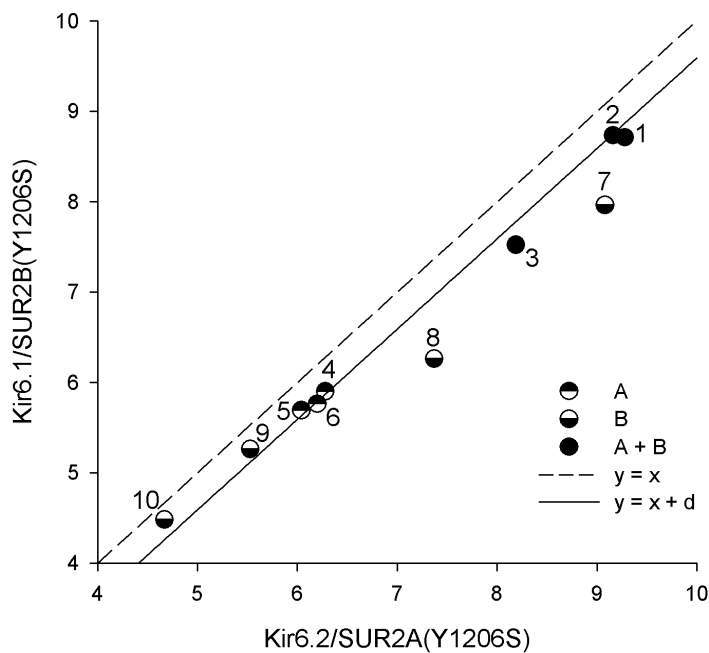


Abb. 23 Korrelationsanalyse, die den Vergleich der Bindung von Sulfonylharnstoffen und Gliniden an der myokardialen Mutante $K_{IR}6.2/SUR2A(Y1206S)$ und an der glattmuskulären Mutante $K_{IR}6.1/SUR2B(Y1206S)$ darstellt. pK_i -Werte und Nummern der Sulfonylharnstoffe und Glinide werden in Tab. 16 aufgeführt, sowie die Resultate der Korrelationsanalyse in Tab. 17. Die gestrichelte Linie beschreibt die Identitätslinie, die durchgehende Linie den besten Fit mit der Steigung 1 (Repaglinid und AZ-DF 265 wurden nicht berücksichtigt) und die Kreise die einzelnen Sulfonylharnstoffe und Glinide und deren Ligandentyp (A/B/A+B).

Zunächst lassen sich hieraus die Schlüsse ziehen, dass zum einen $K_{IR}6.2$ besser an SUR2 koppelt als $K_{IR}6.1$ und dass insbesondere die Piperidino-Verbindungen (Repaglinid) von diesem Unterschied profitieren.

Welche Konsequenzen können nun aus diesen Betrachtungen für das kardiovaskuläre Risikoprofil der Sulfonylharnstoffe und Glinide gezogen werden? Bezüglich der Bindung kann von einer hohen bis mäßigen Selektivität der Sulfonylharnstoffe und auch der Glinide zu dem pankreasspezifischen $K_{IR}6.2/SUR1$ ausgegangen werden. Eine Ausnahme bilden nur Meglitinid und UL-DF 9, bei denen keine Unterschiede der Bindung zwischen pankreatischen und myokardialen sowie vaskulären K_{ATP} -Kanälen nachgewiesen werden konnten.

Tab. 17 Korrelationsanalyse, die die Bindungsaffinitäten der Sulfonylharnstoffe und Glinide an verschiedene K_{ATP} -Kanalsubtypen beschreibt. Die Parameter wurden aus Korrelationsanalysen mittels SigmaPlot gewonnen (z.B. s. Abb. 21, 22, 23). d mit SEM bezeichnet den Abstand des logarithmischen Fits mit der festgesetzten Steigung 1 von der Identitätslinie ($y = x$).

Rezeptortyp	Korrelation	d	$f = 10^{\pm d}$ ($f > 1$)	Anzahl der Ligandentypen
$K_{IR}6.1/SUR2B(Y1206S)$ vs. $SUR2B(Y1206S)$	0,98	$0,41 \pm 0,09$	2,6 (1,7 - 3,9)	10 (Nr. 1-10)
$K_{IR}6.1/SUR2B(Y1206S)$ vs. $K_{IR}6.2/SUR1$	0,98	$-0,66 \pm 0,10$	4,6 (2,8 - 7,2)	8 (Nr. 1-7, 9)
$K_{IR}6.1/SUR2B$ vs. $K_{IR}6.2/SUR1$	0,94	$-1,88 \pm 0,16$	76 (36 - 160)	6 (Nr. 1-6)
$K_{IR}6.1/SUR2B(Y1206S)$ vs. $K_{IR}6.2/SUR2A(Y1206S)$	1,00	$-0,41 \pm 0,05$	2,6 (2,0 - 3,2)	8 (Nr. 1-6, 9+10)
$K_{IR}6.1/SUR2B$ vs. $K_{IR}6.2/SUR2A$	0,97	$-0,79 \pm 0,08$	6,2 (4,2 - 8,9)	8 (Nr.1-3, 6-10)
$K_{IR}6.2/SUR2A$ vs. $K_{IR}6.2/SUR1$	0,98	$-1,29 \pm 0,08$	19 (13 - 28)	6 (Nr. 1-6)

Die Betrachtung der Selektivität der Bindung der Sulfonylharnstoffe und Glinide ist aber zur Abschätzung des kardiovaskulären Risikos unzureichend. Im Vergleich zu den Kompetitionsbindungsexperimenten ist der Unterschied des effektiven Kanalblocks durch Sulfonylharnstoffe und Glinide in „Patch-Clamp“-Versuchen betreffend $K_{IR}6.2/SUR1$ und $K_{IR}6.2/SUR2A$ bzw. $K_{IR}6.2/SUR2B$ noch weitaus deutlicher ausgeprägt. Die Konzentrationen der A-Liganden erreichen bis zur Kanalblockade Werte, die denen eines Kanalblocks von $K_{IR}6.2$ alleine ohne SUR ähneln (66;64;32). Elektrophysiologische Daten sind bisher aber wenig publiziert und aufgrund verschiedener Versuchsbedingungen schwer vergleichbar (vgl. (53;152;167)).

Eine weitere wichtige Einflussgröße auf die K_{ATP} -Kanäle und deren Funktion spielen Substanzen des Zytosols wie z.B. Mg^{2+} , ATP/ADP, etc. (s. 1.2.5). MgADP verstärkt die Inhibition von Sulfonylharnstoffen und Gliniden auf $K_{IR}6.2/SUR1$ und im Gegensatz dazu bleibt der Effekt auf $K_{IR}6.2/SUR2A$ unverändert oder wird sogar abgeschwächt (66;32;160). Es kann daher vermutet werden, dass auch noch andere intrazelluläre Substanzen die K_{ATP} -Kanäle bezüglich der Kanalfunktion beeinflussen.

Abschließend kann eine relative Sicherheit der Sulfonylharnstoffe und Glinide aus dem Vergleich der Selektivität und elektrophysiologischen Untersuchungen an den pankreatischen, myokardialen und kardiovaskulären K_{ATP} -Kanälen sowie den bereits vorhandenen klinischen Studien (UKPDS, 1998) angenommen werden. Kontroverse Ergebnisse durch z.B. Simpson et al. (2006) sollten jedoch im Hinterkopf behalten werden (1;184). Für eine definitive Abklärung der therapeutischen Sicherheit der Sulfonylharnstoffe und Glinide wäre eine prospektive klinische Studie notwendig.

4.3 Effekte der Koexpression von SUR2B(Y1206S) und Selektivität von Glibenclamid und Repaglinid in bezug auf die K_{ATP} -Kanalmutante $K_{IR}6.2/SUR2B(Y1206S)$ - ein Ausblick

Das Vorkommen des K_{ATP} -Kanals $K_{IR}6.2/SUR2B$ in der glatten Muskulatur wurde mehrfach gezeigt (102;90). Bindungsexperimente mit Glibenclamid und Repaglinid sollten beispielhaft klären, ob die in Kapitel 4.1 und 4.2 aufgestellten Hypothesen auch für den glattmuskulären Kanal gelten. Die Interpretationen der Ergebnisse von $K_{IR}6.2/SUR2B$ wurden in dieser Arbeit wieder anhand der Mutation Y1206S durchgeführt (s. Kapitel 4).

Tab. 18 Effekte der Koexpression mit $K_{IR}6.2$ auf die Affinität von SUR2B(Y1206S) für Glibenclamid und Repaglinid in $-\log M$. Der pK_i -Wert \pm SEM wurde als Mittelwert aus drei bis fünf Einzelexperimenten ermittelt.

Nr.	Sulfonylharnstoffe/		pK_i	
	Glinide	Ligandentyp	SUR2B(Y1206S)	$K_{IR}6.2/SUR2B(Y1206S)$
1	Glibenclamid	A + B	$8,18 \pm 0,05$	$8,96 \pm 0,07$
7	Repaglinid	B	$7,30 \pm 0,06$	$8,59 \pm 0,02$

Auch bei Glibenclamid (A+B-Ligand) und Repaglinid (B-Ligand) konnte an $K_{IR}6.2/SUR2B(Y1206S)$ eine deutliche Erhöhung der Bindungsaffinität durch Koexpression gefunden werden. Glibenclamid bindet in Koexpression 6-fach und Repaglinid 15-fach besser an $K_{IR}6.2/SUR2B(Y1206S)$ als an SUR2B(Y1206S) allein (s. Tab. 18, Kapitel 3). Damit ist das Bindungsverhalten bei Koexpression an $K_{IR}6.2/SUR2B(Y1206S)$ fast identisch wie an $K_{IR}6.2/SUR2A(Y1206S)$. Somit scheint auch für die K_{ATP} -Kanal-Mutante $K_{IR}6.2/SUR2B(Y1206S)$ das Modell der zwei Bindungstaschen A und B zu gelten und $K_{IR}6.2$ wirksamer, mit einer besonderen Sensitivität für die Piperidino-Verbindungen, als $K_{IR}6.1$ an die SUR2-Untereinheit zu binden (vgl. 4.1 und 4.2).

Vergleicht man entsprechend Kapitel 4.2 die Selektivität der Bindung von Glibenclamid und Repaglinid an die K_{ATP} -Kanäle $K_{IR}6.1/SUR2B(Y1206S)$, $K_{IR}6.2/SUR2B(Y1206S)$ und $K_{IR}6.2/SUR2A(Y1206S)$, so kann auch hier der Effekt der besseren Kopplung von $K_{IR}6.2$ an SUR2 auf die Affinitätssteigerung bei Koexpression nachgewiesen werden (s. Tab. 19).

Tab. 19 Vergleich der Affinität für Glibenclamid und Repaglinid an den unterschiedlichen K_{ATP} -Kanalsubtypen $K_{IR}6.1/SUR2B(Y1206S)$, $K_{IR}6.2/SUR2B(Y1206S)$ und $K_{IR}6.2/SUR2A(Y1206S)$ in $-\log M$. Der pK_i -Wert \pm SEM wurde als Mittelwert aus drei bis fünf Einzelerperimenten ermittelt.

Nr.	Sulfonylharnstoffe/ Glinide	Ligandentyp	pK_i	pK_i	pK_i
			$K_{IR}6.1/SUR2B$ (Y1206S)	$K_{IR}6.2/SUR2B$ (Y1206S)	$K_{IR}6.2/SUR2A$ (Y1206S)
1	Glibenclamid	A + B	8,75 \pm 0,08	8,96 \pm 0,07	9,28 \pm 0,06
7	Repaglinid	B	7,95 \pm 0,01	8,59 \pm 0,02	9,08 \pm 0,02

Die Affinität von Glibenclamid steigert sich jeweils ca. um den Faktor 2 von $K_{IR}6.1/SUR2B(Y1206S)$ über $K_{IR}6.2/SUR2B(Y1206S)$ zu $K_{IR}6.2/SUR2A(Y1206S)$. Bei Repaglinid ist die Affinität jeweils um den Faktor 3-4 von $K_{IR}6.1/SUR2B(Y1206S)$ über $K_{IR}6.2/SUR2B(Y1206S)$ zu $K_{IR}6.2/SUR2A(Y1206S)$ erhöht. Da SUR2A(Y1206S) und SUR2B(Y1206S) sich in ihrer Bindung gegenüber Sulfonylharnstoffen und Gliniden nicht unterscheiden, scheint der geringe Unterschied zwischen $K_{IR}6.2/SUR2A(Y1206S)$ und $K_{IR}6.2/SUR2B(Y1206S)$ in der Affinität aus der Koexpression mit SUR2A oder SUR2B zu stammen. Entscheidend könnten daher die C-terminalen 42 Aminosäuren von SUR2 sein (s. 1.2.2), die eine Änderung in der Konformation des K_{ATP} -Kanals oder eine allosterische Wechselwirkung mit $K_{IR}6.2$ hervorrufen.

Die Ergebnisse und Interpretationen dieser Arbeit wurden in „The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics“ 2007 publiziert (Winkler et al.: Testing the bipartite Model of the Sulfonylurea Receptor Binding Site: Binding of A-, B- and A+B-Site Ligands, JPET, Vol. 322: 701-708, 2007).

5 ZUSAMMENFASSUNG

Sulfonylharnstoffe und Glinide werden in der Therapie des Diabetes mellitus Typ 2 in großem Umfang eingesetzt. Sie binden an den ATP-empfindlichen Kaliumkanal (K_{ATP} -Kanal) der β -Zelle im Pankreas und bewirken ein Schließen des Kanals. Die dadurch hervorgerufene Depolarisation der β -Zelle leitet eine (Glukose-unabhängige) Insulinsekretion ein. K_{ATP} -Kanäle bestehen aus Sulfonylharnstoffrezeptoren (SUR_x), die die Kanalaktivität steuern, und porenformenden Untereinheiten ($K_{IR6.x}$). Neben den K_{ATP} -Kanälen im Pankreas ($K_{IR6.2}/SUR1$) gibt es auch K_{ATP} -Kanäle anderer Zusammensetzung in verschiedenen Geweben z. B. im kardiovaskulären System (Herz: $K_{IR6.2}/SUR2A$), Gefäß: $K_{IR6.1}/SUR2B$). Kardiovaskuläre unerwünschte Arzneimittelwirkungen werden daher in Zusammenhang mit der Einnahme von Sulfonylharnstoffen und Gliniden vermutet.

In dieser Arbeit wurde der Bindungsschritt an eine Mutante des glattmuskulären SUR, SUR2B(Y1206S), untersucht. Diese Mutante besitzt eine ~5-fach höhere Affinität für Glibenclamid als der Wildtyp und ermöglicht überhaupt erst präzise Messungen. Die Mutante wurde in HEK293-Zellen exprimiert und in Kompetitions-experimenten mit 3H -Glibenclamid wurde die Affinität ausgewählter Sulfonylharnstoffe und Glinide der Ligandentypen A, A+B und B in intakten Zellen bei physiologischen Bedingungen bestimmt. Zusätzlich wurde untersucht, inwieweit Koexpression mit $K_{IR6.1}$ bzw. $K_{IR6.2}$ die Affinität des SUR für die verschiedenen Liganden beeinflusst. Die Ergebnisse zeigen deutliche Affinitätsunterschiede der einzelnen Liganden. Koexpression von SUR2B(Y1206S) mit $K_{IR6.1}$ erhöht die Affinität für die Liganden (außer UL-DF 9) um den Faktor 2,6. Im Vergleich der K_{ATP} -Kanalsubtypen ist die Kopplung der SUR2-Untereinheit an $K_{IR6.2}$ wirksamer als an $K_{IR6.1}$, wobei dieser Unterschied bei den Piperidino-Verbindungen (Repaglinid und AZ-DF 265) besonders ausgeprägt ist.

Die Ergebnisse zeigen, dass das für SUR1 aufgestellte Modell der Unterteilung der Bindungstasche für Sulfonylharnstoffe in zwei Kompartimente, A und B, auch für den SUR2B gilt. Verglichen mit der Bindung an die anderen SUR- bzw. K_{ATP} -Kanal-Subtypen zeigen die untersuchten Sulfonylharnstoffe und Glinide eine

schwächere Affinität für den vaskulären als für den pankreatischen K_{ATP} -Kanal. Die Selektivität der Bindung ist jedoch schwächer als die in elektrophysiologischen Experimenten bestimmte Selektivität. Dies zeigt, dass die Transduktion der Bindung der Sulfonylharnstoffe/Glinide in das Schließen des Kanals ebenfalls eine Kanalsubtyp-spezifische Komponente enthält.

6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *Lancet* 1998 September 12;352(9131):837-53.
2. Aguilar-Bryan L, Bryan J. Molecular biology of adenosine triphosphate-sensitive potassium channels. *Endocr Rev* 1999 April;20(2):101-35.
3. Aguilar-Bryan L, Nichols CG, Wechsler SW, Clement JP, Boyd AE, III, Gonzalez G, Herrera-Sosa H, Nguy K, Bryan J, Nelson DA. Cloning of the beta cell high-affinity sulfonylurea receptor: a regulator of insulin secretion. *Science* 1995 April 21;268(5209):423-6.
4. Ahluwalia J, Tinker A, Clapp LH, Duchon MR, Abramov AY, Pope S, Nobles M, Segal AW. The large-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel is essential for innate immunity. *Nature* 2004 February 26;427(6977):853-8.
5. Antcliff JF, Haider S, Proks P, Sansom MS, Ashcroft FM. Functional analysis of a structural model of the ATP-binding site of the KATP channel Kir6.2 subunit. *EMBO J* 2005 January 26;24(2):229-39.
6. Aronow WS, Ahn C. Incidence of new coronary events in older persons with diabetes mellitus and prior myocardial infarction treated with sulfonylureas, insulin, metformin, and diet alone. *Am J Cardiol* 2001 September 1;88(5):556-7.
7. Ashcroft FM, Gribble FM. ATP-sensitive K⁺ channels and insulin secretion: their role in health and disease. *Diabetologia* 1999 August;42(8):903-19.
8. Ashcroft FM, Harrison DE, Ashcroft SJ. Glucose induces closure of single potassium channels in isolated rat pancreatic beta-cells. *Nature* 1984 November 29;312(5993):446-8.
9. Ashfield R, Gribble FM, Ashcroft SJ, Ashcroft FM. Identification of the high-affinity tolbutamide site on the SUR1 subunit of the K(ATP) channel. *Diabetes* 1999 June;48(6):1341-7.
10. Ashford ML, Sturgess NC, Trout NJ, Gardner NJ, Hales CN. Adenosine-5'-triphosphate-sensitive ion channels in neonatal rat cultured central neurones. *Pflugers Arch* 1988 August;412(3):297-304.
11. Babenko AP, Bryan J. SUR-dependent modulation of KATP channels by an N-terminal KIR6.2 peptide. Defining intersubunit gating interactions. *J Biol Chem* 2002 November 15;277(46):43997-4004.

12. Babenko AP, Bryan J. Sur domains that associate with and gate KATP pores define a novel gatekeeper. *J Biol Chem* 2003 October 24;278(43):41577-80.
13. Babenko AP, Gonzalez G, Bryan J. The N-terminus of KIR6.2 limits spontaneous bursting and modulates the ATP-inhibition of KATP channels. *Biochem Biophys Res Commun* 1999 February 16;255(2):231-8.
14. Babenko AP, Gonzalez G, Bryan J. The tolbutamide site of SUR1 and a mechanism for its functional coupling to K(ATP) channel closure. *FEBS Lett* 1999 October 15;459(3):367-76.
15. Bakos E, Evers R, Calenda G, Tusnady GE, Szakacs G, Varadi A, Sarkadi B. Characterization of the amino-terminal regions in the human multidrug resistance protein (MRP1). *J Cell Sci* 2000 December;113 Pt 24:4451-61.
16. Bari F, Louis TM, Busija DW. Effects of ischemia on cerebral arteriolar dilation to arterial hypoxia in piglets. *Stroke* 1998 January;29(1):222-7.
17. Baukrowitz T, Fakler B. KATP channels gated by intracellular nucleotides and phospholipids. *Eur J Biochem* 2000 October;267(19):5842-8.
18. Baukrowitz T, Schulte U, Oliver D, Herlitze S, Krauter T, Tucker SJ, Ruppersberg JP, Fakler B. PIP2 and PIP as determinants for ATP inhibition of KATP channels. *Science* 1998 November 6;282(5391):1141-4.
19. Beech DJ, Zhang H, Nakao K, Bolton TB. K channel activation by nucleotide diphosphates and its inhibition by glibenclamide in vascular smooth muscle cells. *Br J Pharmacol* 1993 October;110(2):573-82.
20. Biere H, Rufer C, Ahrens H, Loge O, Schroder E. Blood glucose lowering sulfonamides with asymmetric carbon atoms. *J Med Chem* 1974 July;17(7):716-21.
21. Bray KM, Quast U. A specific binding site for K⁺ channel openers in rat aorta. *J Biol Chem* 1992 June 15;267(17):11689-92.
22. Brayden JE. Functional roles of KATP channels in vascular smooth muscle. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2002 April;29(4):312-6.
23. Brenner R, Perez GJ, Bonev AD, Eckman DM, Kosek JC, Wiler SW, Patterson AJ, Nelson MT, Aldrich RW. Vasoregulation by the beta1 subunit of the calcium-activated potassium channel. *Nature* 2000 October 19;407(6806):870-6.
24. Brown GR, Foubister AJ. Receptor binding sites of hypoglycemic sulfonylureas and related [(acylamino)alkyl]benzoic acids. *J Med Chem* 1984 January;27(1):79-81.

25. Bryan J, Crane A, Vila-Carriles WH, Babenko AP, Aguilar-Bryan L. Insulin secretagogues, sulfonylurea receptors and K(ATP) channels. *Curr Pharm Des* 2005;11(21):2699-716.
26. Bryan J, Aguilar-Bryan L. Sulfonylurea receptors: ABC transporters that regulate ATP-sensitive K(+) channels. *Biochim Biophys Acta* 1999 December 6;1461(2):285-303.
27. Bryan J, Vila-Carriles WH, Zhao G, Babenko AP, Aguilar-Bryan L. Toward linking structure with function in ATP-sensitive K+ channels. *Diabetes* 2004 December;53 Suppl 3:S104-S112.
28. Buckingham SD, Kidd JF, Law RJ, Franks CJ, Sattelle DB. Structure and function of two-pore-domain K+ channels: contributions from genetic model organisms. *Trends Pharmacol Sci* 2005 July;26(7):361-7.
29. Burton FL, Smith GL. The effect of cromakalim on intracellular [Ca²⁺] in isolated rat skeletal muscle during fatigue and metabolic blockade. *Exp Physiol* 1997 May;82(3):469-83.
30. Capener CE, Proks P, Ashcroft FM, Sansom MS. Filter flexibility in a mammalian K channel: models and simulations of Kir6.2 mutants. *Biophys J* 2003 April;84(4):2345-56.
31. Cartier EA, Conti LR, Vandenberg CA, Shyng SL. Defective trafficking and function of KATP channels caused by a sulfonylurea receptor 1 mutation associated with persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001 February 27;98(5):2882-7.
32. Chachin M, Yamada M, Fujita A, Matsuoka T, Matsushita K, Kurachi Y. Nateglinide, a D-phenylalanine derivative lacking either a sulfonylurea or benzamido moiety, specifically inhibits pancreatic beta-cell-type K(ATP) channels. *J Pharmacol Exp Ther* 2003 March;304(3):1025-32.
33. Chan KW, Zhang H, Logothetis DE. N-terminal transmembrane domain of the SUR controls trafficking and gating of Kir6 channel subunits. *EMBO J* 2003 August 1;22(15):3833-43.
34. Chang G. Structure of MsbA from *Vibrio cholera*: a multidrug resistance ABC transporter homolog in a closed conformation. *J Mol Biol* 2003 July 4;330(2):419-30.
35. Chang G, Roth CB. Structure of MsbA from *E. coli*: a homolog of the multidrug resistance ATP binding cassette (ABC) transporters. *Science* 2001 September 7;293(5536):1793-800.
36. Cheng Y, Prusoff WH. Relationship between the inhibition constant (K₁) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I₅₀) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol* 1973 December 1;22(23):3099-108.

37. Christopoulos A. Assessing the distribution of parameters in models of ligand-receptor interaction: to log or not to log. *Trends Pharmacol Sci* 1998 September;19(9):351-7.
38. Chutkow WA, Makielski JC, Nelson DJ, Burant CF, Fan Z. Alternative splicing of sur2 Exon 17 regulates nucleotide sensitivity of the ATP-sensitive potassium channel. *J Biol Chem* 1999 May 7;274(19):13656-65.
39. Chutkow WA, Pu J, Wheeler MT, Wada T, Makielski JC, Burant CF, McNally EM. Episodic coronary artery vasospasm and hypertension develop in the absence of Sur2 K(ATP) channels. *J Clin Invest* 2002 July;110(2):203-8.
40. Chutkow WA, Simon MC, Le Beau MM, Burant CF. Cloning, tissue expression, and chromosomal localization of SUR2, the putative drug-binding subunit of cardiac, skeletal muscle, and vascular KATP channels. *Diabetes* 1996 October;45(10):1439-45.
41. Clement JP, Kunjilwar K, Gonzalez G, Schwanstecher M, Panten U, Aguilar-Bryan L, Bryan J. Association and stoichiometry of K(ATP) channel subunits. *Neuron* 1997 May;18(5):827-38.
42. Cleveland JC, Jr., Meldrum DR, Cain BS, Banerjee A, Harken AH. Oral sulfonylurea hypoglycemic agents prevent ischemic preconditioning in human myocardium. Two paradoxes revisited. *Circulation* 1997 July 1;96(1):29-32.
43. Cohen MV, Baines CP, Downey JM. Ischemic preconditioning: from adenosine receptor to KATP channel. *Annu Rev Physiol* 2000;62:79-109.
44. Conti LR, Radeke CM, Vandenberg CA. Membrane targeting of ATP-sensitive potassium channel. Effects of glycosylation on surface expression. *J Biol Chem* 2002 July 12;277(28):25416-22.
45. Cook DL, Hales CN. Intracellular ATP directly blocks K⁺ channels in pancreatic B-cells. *Nature* 1984 September 20;311(5983):271-3.
46. Crane A, Aguilar-Bryan L. Assembly, maturation, and turnover of K(ATP) channel subunits. *J Biol Chem* 2004 March 5;279(10):9080-90.
47. Crawford RM, Ranki HJ, Botting CH, Budas GR, Jovanovic A. Creatine kinase is physically associated with the cardiac ATP-sensitive K⁺ channel in vivo. *FASEB J* 2002 January;16(1):102-4.
48. Cui N, Kang Y, He Y, Leung YM, Xie H, Pasyk EA, Gao X, Sheu L, Hansen JB, Wahl P, Tsushima RG, Gaisano HY. H3 domain of syntaxin 1A inhibits KATP channels by its actions on the sulfonylurea receptor 1 nucleotide-binding folds-1 and -2. *J Biol Chem* 2004 December 17;279(51):53259-65.

49. Dabrowski M, Wahl P, Holmes WE, Ashcroft FM. Effect of repaglinide on cloned beta cell, cardiac and smooth muscle types of ATP-sensitive potassium channels. *Diabetologia* 2001 June;44(6):747-56.
50. Daut J, Maier-Rudolph W, von BN, Mehrke G, Gunther K, Goedel-Meinen L. Hypoxic dilation of coronary arteries is mediated by ATP-sensitive potassium channels. *Science* 1990 March 16;247(4948):1341-4.
51. de Wet H, Mikhailov MV, Fotinou C, Dreger M, Craig TJ, Venien-Bryan C, Ashcroft FM. Studies of the ATPase activity of the ABC protein SUR1. *FEBS J* 2007 July;274(14):3532-44.
52. Dickinson KE, Bryson CC, Cohen RB, Rogers L, Green DW, Atwal KS. Nucleotide regulation and characteristics of potassium channel opener binding to skeletal muscle membranes. *Mol Pharmacol* 1997 September;52(3):473-81.
53. Dorschner H, Brekardin E, Uhde I, Schwanstecher C, Schwanstecher M. Stoichiometry of sulfonylurea-induced ATP-sensitive potassium channel closure. *Mol Pharmacol* 1999 June;55(6):1060-6.
54. Doupnik CA, Davidson N, Lester HA. The inward rectifier potassium channel family. *Curr Opin Neurobiol* 1995 June;5(3):268-77.
55. Edwards G, Weston AH. The pharmacology of ATP-sensitive potassium channels. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1993;33:597-637.
56. Enkvetchakul D, Nichols CG. Gating mechanism of KATP channels: function fits form. *J Gen Physiol* 2003 November;122(5):471-80.
57. Farouque HM, Worthley SG, Meredith IT, Skyrme-Jones RA, Zhang MJ. Effect of ATP-sensitive potassium channel inhibition on resting coronary vascular responses in humans. *Circ Res* 2002 February 8;90(2):231-6.
58. Gadsby DC, Nagel G, Hwang TC. The CFTR chloride channel of mammalian heart. *Annu Rev Physiol* 1995;57:387-416.
59. Garratt KN, Brady PA, Hassinger NL, Grill DE, Terzic A, Holmes DR, Jr. Sulfonylurea drugs increase early mortality in patients with diabetes mellitus after direct angioplasty for acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 1999 January;33(1):119-24.
60. Giblin JP, Leaney JL, Tinker A. The molecular assembly of ATP-sensitive potassium channels. Determinants on the pore forming subunit. *J Biol Chem* 1999 August 6;274(32):22652-9.
61. Gogelein H. Inhibition of cardiac ATP-dependent potassium channels by sulfonylurea drugs. *Curr Opin Investig Drugs* 2001 January;2(1):72-80.

62. Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 1977 July;36(1):59-74.
63. Gramolini A, Renaud JM. Blocking ATP-sensitive K⁺ channel during metabolic inhibition impairs muscle contractility. *Am J Physiol* 1997 June;272(6 Pt 1):C1936-C1946.
64. Gribble FM, Ashcroft FM. Differential sensitivity of beta-cell and extrapancreatic K(ATP) channels to gliclazide. *Diabetologia* 1999 July;42(7):845-8.
65. Gribble FM, Proks P, Corkey BE, Ashcroft FM. Mechanism of cloned ATP-sensitive potassium channel activation by oleoyl-CoA. *J Biol Chem* 1998 October 9;273(41):26383-7.
66. Gribble FM, Tucker SJ, Seino S, Ashcroft FM. Tissue specificity of sulfonylureas: studies on cloned cardiac and beta-cell K(ATP) channels. *Diabetes* 1998 September;47(9):1412-8.
67. Gross GJ, Fryer RM. Sarcolemmal versus mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channels and myocardial preconditioning. *Circ Res* 1999 May 14;84(9):973-9.
68. Gross GJ, Peart JN. KATP channels and myocardial preconditioning: an update. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003 September;285(3):H921-H930.
69. Grover GJ. Protective effects of ATP-sensitive potassium-channel openers in experimental myocardial ischemia. *J Cardiovasc Pharmacol* 1994;24 Suppl 4:S18-S27.
70. Gutman GA, Chandy KG, Adelman JP, Aiyar J, Bayliss DA, Clapham DE, Covarrubias M, Desir GV, Furuichi K, Ganetzky B, Garcia ML, Grissmer S, Jan LY, Karschin A, Kim D, Kuperschmidt S, Kurachi Y, Lazdunski M, Lesage F, Lester HA, McKinnon D, Nichols CG, O'Kelly I, Robbins J, Robertson GA et al. International Union of Pharmacology. XLI. Compendium of voltage-gated ion channels: potassium channels. *Pharmacol Rev* 2003 December;55(4):583-6.
71. Gutsche K, Schroder E, Rufer C, Loge O. [New hypoglycemic benzenesulfonamido-pyrimidines N-substituted 4- N-(2-pyrimidinyl) sulfonyl-phenylacetamides]. *Arzneimittelforschung* 1974 July;24(7):1028-39.
72. Hambrock A, Loffler-Walz C, Kloor D, Delabar U, Horio Y, Kurachi Y, Quast U. ATP-Sensitive K⁺ channel modulator binding to sulfonylurea receptors SUR2A and SUR2B: opposite effects of MgADP. *Mol Pharmacol* 1999 May;55(5):832-40.

73. Hambrock A, Loffler-Walz C, Kurachi Y, Quast U. Mg²⁺ and ATP dependence of K(ATP) channel modulator binding to the recombinant sulphonylurea receptor, SUR2B. *Br J Pharmacol* 1998 October;125(3):577-83.
74. Hambrock A, Loffler-Walz C, Quast U. Glibenclamide binding to sulphonylurea receptor subtypes: dependence on adenine nucleotides. *Br J Pharmacol* 2002 August;136(7):995-1004.
75. Hambrock A, Loffler-Walz C, Russ U, Lange U, Quast U. Characterization of a mutant sulphonylurea receptor SUR2B with high affinity for sulphonylureas and openers: differences in the coupling to Kir6.x subtypes. *Mol Pharmacol* 2001 July;60(1):190-9.
76. Hanley PJ, Daut J. K(ATP) channels and preconditioning: a re-examination of the role of mitochondrial K(ATP) channels and an overview of alternative mechanisms. *J Mol Cell Cardiol* 2005 July;39(1):17-50.
77. Hansen AM, Christensen IT, Hansen JB, Carr RD, Ashcroft FM, Wahl P. Differential interactions of nateglinide and repaglinide on the human beta-cell sulphonylurea receptor 1. *Diabetes* 2002 September;51(9):2789-95.
78. Hayabuchi Y, Davies NW, Standen NB. Angiotensin II inhibits rat arterial KATP channels by inhibiting steady-state protein kinase A activity and activating protein kinase C ϵ . *J Physiol* 2001 January 15;530(Pt 2):193-205.
79. Heginbotham L, Lu Z, Abramson T, MacKinnon R. Mutations in the K⁺ channel signature sequence. *Biophys J* 1994 April;66(4):1061-7.
80. Heginbotham L, MacKinnon R. The aromatic binding site for tetraethylammonium ion on potassium channels. *Neuron* 1992 March;8(3):483-91.
81. Hille B. Ion channels of excitable membranes. 2001. 3rd Edition Sinauer Associates Inc. Sunderland.
82. Hu S, Wang S, Dunning BE. Tissue selectivity of antidiabetic agent nateglinide: study on cardiovascular and beta-cell K(ATP) channels. *J Pharmacol Exp Ther* 1999 December;291(3):1372-9.
83. Huizar JF, Gonzalez LA, Alderman J, Smith HS. Sulphonylureas attenuate electrocardiographic ST-segment elevation during an acute myocardial infarction in diabetics. *J Am Coll Cardiol* 2003 September 17;42(6):1017-21.
84. Hung LW, Wang IX, Nikaido K, Liu PQ, Ames GF, Kim SH. Crystal structure of the ATP-binding subunit of an ABC transporter. *Nature* 1998 December 17;396(6712):703-7.

85. Inagaki N, Gono T, Clement JP, Namba N, Inazawa J, Gonzalez G, Aguilar-Bryan L, Seino S, Bryan J. Reconstitution of IKATP: an inward rectifier subunit plus the sulfonylurea receptor. *Science* 1995 November 17;270(5239):1166-70.
86. Inagaki N, Gono T, Clement JP, Wang CZ, Aguilar-Bryan L, Bryan J, Seino S. A family of sulfonylurea receptors determines the pharmacological properties of ATP-sensitive K⁺ channels. *Neuron* 1996 May;16(5):1011-7.
87. Inagaki N, Seino S. [ATP sensitive potassium channels--Kir6.2 gene]. *Nippon Rinsho* 1997 October;55 Suppl:452-7.
88. Inoue I, Nagase H, Kishi K, Higuti T. ATP-sensitive K⁺ channel in the mitochondrial inner membrane. *Nature* 1991 July 18;352(6332):244-7.
89. Ishizaka H, Kuo L. Acidosis-induced coronary arteriolar dilation is mediated by ATP-sensitive potassium channels in vascular smooth muscle. *Circ Res* 1996 January;78(1):50-7.
90. Isomoto S, Kondo C, Yamada M, Matsumoto S, Higashiguchi O, Horio Y, Matsuzawa Y, Kurachi Y. A novel sulfonylurea receptor forms with BIR (Kir6.2) a smooth muscle type ATP-sensitive K⁺ channel. *J Biol Chem* 1996 October 4;271(40):24321-4.
91. Jackson WF. Arteriolar tone is determined by activity of ATP-sensitive potassium channels. *Am J Physiol* 1993 November;265(5 Pt 2):H1797-H1803.
92. Jackson WF, Konig A, Dambacher T, Busse R. Prostacyclin-induced vasodilation in rabbit heart is mediated by ATP-sensitive potassium channels. *Am J Physiol* 1993 January;264(1 Pt 2):H238-H243.
93. Jones PA, Tucker SJ, Ashcroft FM. Multiple sites of interaction between the intracellular domains of an inwardly rectifying potassium channel, Kir6.2. *FEBS Lett* 2001 November 9;508(1):85-9.
94. Jones PM, George AM. Mechanism of ABC transporters: a molecular dynamics simulation of a well characterized nucleotide-binding subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002 October 1;99(20):12639-44.
95. Jones PM, George AM. The ABC transporter structure and mechanism: perspectives on recent research. *Cell Mol Life Sci* 2004 March;61(6):682-99.
96. Kamp F, Hamilton JA, Kamp F, Westerhoff HV, Hamilton JA. Movement of fatty acids, fatty acid analogues, and bile acids across phospholipid bilayers. *Biochemistry* 1993 October 19;32(41):11074-86.

97. Kanatsuka H, Sekiguchi N, Sato K, Akai K, Wang Y, Komaru T, Ashikawa K, Takishima T. Microvascular sites and mechanisms responsible for reactive hyperemia in the coronary circulation of the beating canine heart. *Circ Res* 1992 October;71(4):912-22.
98. Karpowich N, Martsinkevich O, Millen L, Yuan YR, Dai PL, MacVey K, Thomas PJ, Hunt JF. Crystal structures of the MJ1267 ATP binding cassette reveal an induced-fit effect at the ATPase active site of an ABC transporter. *Structure* 2001 July 3;9(7):571-86.
99. Katz LB, Giardino EC, Salata JJ, Moore JB, Jr., Falotico R. RWJ 26629, a new potassium channel opener and vascular smooth muscle relaxant: a potential antihypertensive and antianginal agent. *J Pharmacol Exp Ther* 1993 November;267(2):648-56.
100. Kinoshita H, Katusic ZS. Role of potassium channels in relaxations of isolated canine basilar arteries to acidosis. *Stroke* 1997 February;28(2):433-7.
101. Kleppisch T, Nelson MT. Adenosine activates ATP-sensitive potassium channels in arterial myocytes via A₂ receptors and cAMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995 December 19;92(26):12441-5.
102. Koh SD, Bradley KK, Rae MG, Keef KD, Horowitz B, Sanders KM. Basal activation of ATP-sensitive potassium channels in murine colonic smooth muscle cell. *Biophys J* 1998 October;75(4):1793-800.
103. Koster JC, Sha Q, Nichols CG. Sulfonylurea and K(+) channel opener sensitivity of K(ATP) channels. Functional coupling of Kir6.2 and SUR1 subunits. *J Gen Physiol* 1999 August;114(2):203-13.
104. Krauter T, Ruppertsberg JP, Baukowitz T. Phospholipids as modulators of K(ATP) channels: distinct mechanisms for control of sensitivity to sulphonylureas, K(+) channel openers, and ATP. *Mol Pharmacol* 2001 May;59(5):1086-93.
105. Kubo Y, Baldwin TJ, Jan YN, Jan LY. Primary structure and functional expression of a mouse inward rectifier potassium channel. *Nature* 1993 March 11;362(6416):127-33.
106. Kuo A, Gulbis JM, Antcliff JF, Rahman T, Lowe ED, Zimmer J, Cuthbertson J, Ashcroft FM, Ezaki T, Doyle DA. Crystal structure of the potassium channel KirBac1.1 in the closed state. *Science* 2003 June 20;300(5627):1922-6.
107. Landry DW, Oliver JA. The ATP-sensitive K⁺ channel mediates hypotension in endotoxemia and hypoxic lactic acidosis in dog. *J Clin Invest* 1992 June;89(6):2071-4.

108. Latorre R, Oberhauser A, Labarca P, Alvarez O. Varieties of calcium-activated potassium channels. *Annu Rev Physiol* 1989;51:385-99.
109. Leicher T, Roeper J, Weber K, Wang X, Pongs O. Structural and functional characterization of human potassium channel subunit beta 1 (KCNA1B). *Neuropharmacology* 1996;35(7):787-95.
110. Li JH, Yasay GD, Zografos P, Kau ST, Ohnmacht CJ, Russell K, Empfield JR, Brown FJ, Trainor DA, Bonev AD, . Zeneca ZD6169 and its analogs from a novel series of anilide tertiary carbinols: in vitro KATP channel opening activity in bladder detrusor. *Pharmacology* 1995 June;51(1):33-42.
111. Light PE, Comtois AS, Renaud JM. The effect of glibenclamide on frog skeletal muscle: evidence for K⁺ATP channel activation during fatigue. *J Physiol* 1994 March 15;475(3):495-507.
112. Linde C, Loffler C, Quast U. Inhibition by protein kinase C of the 86Rb⁺ efflux and vasorelaxation induced by P1075, a K(ATP) channel opener, in rat isolated aorta. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1997 September;356(3):425-32.
113. Linde C, Quast U. Potentiation of P1075-induced K⁺ channel opening by stimulation of adenylate cyclase in rat isolated aorta. *Br J Pharmacol* 1995 June;115(3):515-21.
114. Liu GX, Hanley PJ, Ray J, Daut J. Long-chain acyl-coenzyme A esters and fatty acids directly link metabolism to K(ATP) channels in the heart. *Circ Res* 2001 May 11;88(9):918-24.
115. Locher KP, Lee AT, Rees DC. The E. coli BtuCD structure: a framework for ABC transporter architecture and mechanism. *Science* 2002 May 10;296(5570):1091-8.
116. Loffler-Walz C, Hambrock A, Quast U. Interaction of K(ATP) channel modulators with sulfonylurea receptor SUR2B: implication for tetramer formation and allosteric coupling of subunits. *Mol Pharmacol* 2002 February;61(2):407-14.
117. Logothetis DE, Jin T, Lupyán D, Rosenhouse-Dantsker A. Phosphoinositide-mediated gating of inwardly rectifying K(+) channels. *Pflugers Arch* 2007 October;455(1):83-95.
118. Loussouarn G, Phillips LR, Masia R, Rose T, Nichols CG. Flexibility of the Kir6.2 inward rectifier K(+) channel pore. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001 March 27;98(7):4227-32.
119. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951 November;193(1):265-75.

120. Luckhoff A, Busse R. Calcium influx into endothelial cells and formation of endothelium-derived relaxing factor is controlled by the membrane potential. *Pflugers Arch* 1990 May;416(3):305-11.
121. Lybaert P, Vanbellinghen AM, Quertinmont E, Petein M, Meuris S, Lebrun P. KATP channel subunits are expressed in the epididymal epithelium in several mammalian species. *Biol Reprod* 2008 August;79(2):253-61.
122. Lynch JJ, Jr., Sanguinetti MC, Kimura S, Bassett AL. Therapeutic potential of modulating potassium currents in the diseased myocardium. *FASEB J* 1992 August;6(11):2952-60.
123. Markworth E, Schwanstecher C, Schwanstecher M. *Diabetes* 2000 September;49(9):1413-8.
124. Masia R, Enkvetchakul D, Nichols CG. Differential nucleotide regulation of KATP channels by SUR1 and SUR2A. *J Mol Cell Cardiol* 2005 September;39(3):491-501.
125. Matsuo M, Kimura Y, Ueda K. KATP channel interaction with adenine nucleotides. *J Mol Cell Cardiol* 2005 June;38(6):907-16.
126. Matsuo M, Tanabe K, Kioka N, Amachi T, Ueda K. Different binding properties and affinities for ATP and ADP among sulfonylurea receptor subtypes, SUR1, SUR2A, and SUR2B. *J Biol Chem* 2000 September 15;275(37):28757-63.
127. Matsushita K, Kinoshita K, Matsuoka T, Fujita A, Fujikado T, Tano Y, Nakamura H, Kurachi Y. Intramolecular interaction of SUR2 subtypes for intracellular ADP-Induced differential control of K(ATP) channels. *Circ Res* 2002 March 22;90(5):554-61.
128. Meinert CL, Knatterud GL, Prout TE, Klimt CR. A study of the effects of hypoglycemic agents on vascular complications in patients with adult-onset diabetes. II. Mortality results. *Diabetes* 1970;19:Suppl-830.
129. Merkel LA, Lappe RW, Rivera LM, Cox BF, Perrone MH. Demonstration of vasorelaxant activity with an A1-selective adenosine agonist in porcine coronary artery: involvement of potassium channels. *J Pharmacol Exp Ther* 1992 February;260(2):437-43.
130. Mikhailov MV, Campbell JD, de WH, Shimomura K, Zadek B, Collins RF, Sansom MS, Ford RC, Ashcroft FM. 3-D structural and functional characterization of the purified KATP channel complex Kir6.2-SUR1. *EMBO J* 2005 December 7;24(23):4166-75.
131. Mikhailov MV, Mikhailova EA, Ashcroft SJ. Investigation of the molecular assembly of beta-cell K(ATP) channels. *FEBS Lett* 2000 September 29;482(1-2):59-64.

132. Mikhailov MV, Mikhailova EA, Ashcroft SJ. Molecular structure of the glibenclamide binding site of the beta-cell K(ATP) channel. *FEBS Lett* 2001 June 15;499(1-2):154-60.
133. Miki T, Seino S. Roles of KATP channels as metabolic sensors in acute metabolic changes. *J Mol Cell Cardiol* 2005 June;38(6):917-25.
134. Miki T, Suzuki M, Shibasaki T, Uemura H, Sato T, Yamaguchi K, Koseki H, Iwanaga T, Nakaya H, Seino S. Mouse model of Prinzmetal angina by disruption of the inward rectifier Kir6.1. *Nat Med* 2002 May;8(5):466-72.
135. Miura H, Wachtel RE, Loberiza FR, Jr., Saito T, Miura M, Nicolosi AC, Gutterman DD. Diabetes mellitus impairs vasodilation to hypoxia in human coronary arterioles: reduced activity of ATP-sensitive potassium channels. *Circ Res* 2003 February 7;92(2):151-8.
136. Miyoshi H, Nakaya Y. Calcitonin gene-related peptide activates the K⁺ channels of vascular smooth muscle cells via adenylate cyclase. *Basic Res Cardiol* 1995 July;90(4):332-6.
137. Miyoshi Y, Nakaya Y. Angiotensin II blocks ATP-sensitive K⁺ channels in porcine coronary artery smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1991 December 16;181(2):700-6.
138. Miyoshi Y, Nakaya Y, Wakatsuki T, Nakaya S, Fujino K, Saito K, Inoue I. Endothelin blocks ATP-sensitive K⁺ channels and depolarizes smooth muscle cells of porcine coronary artery. *Circ Res* 1992 March;70(3):612-6.
139. Moody JE, Millen L, Binns D, Hunt JF, Thomas PJ. Cooperative, ATP-dependent association of the nucleotide binding cassettes during the catalytic cycle of ATP-binding cassette transporters. *J Biol Chem* 2002 June 14;277(24):21111-4.
140. Moreau C, Prost AL, Derand R, Vivaudou M. SUR, ABC proteins targeted by KATP channel openers. *J Mol Cell Cardiol* 2005 June;38(6):951-63.
141. Murphy ME, Brayden JE. Apamin-sensitive K⁺ channels mediate an endothelium-dependent hyperpolarization in rabbit mesenteric arteries. *J Physiol* 1995 December 15;489 (Pt 3):723-34.
142. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986 November;74(5):1124-36.
143. Nelson MT, Huang Y, Brayden JE, Hescheler J, Standen NB. Arterial dilations in response to calcitonin gene-related peptide involve activation of K⁺ channels. *Nature* 1990 April 19;344(6268):770-3.

144. Nelson MT, Quayle JM. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *Am J Physiol* 1995 April;268(4 Pt 1):C799-C822.
145. Nichols CG, Lederer WJ. Adenosine triphosphate-sensitive potassium channels in the cardiovascular system. *Am J Physiol* 1991 December;261(6 Pt 2):H1675-H1686.
146. Nichols CG, Lopatin AN. Inward rectifier potassium channels. *Annu Rev Physiol* 1997;59:171-91.
147. Nichols CG, Shyng SL, Nestorowicz A, Glaser B, Clement JP, Gonzalez G, Aguilar-Bryan L, Permutt MA, Bryan J. Adenosine diphosphate as an intracellular regulator of insulin secretion. *Science* 1996 June 21;272(5269):1785-7.
148. Nielsen FE, Bodvarsdottir TB, Worsaae A, MacKay P, Stidsen CE, Boonen HC, Pridal L, Arkhammar PO, Wahl P, Ynddal L, Junager F, Dragsted N, Tagmose TM, Mogensen JP, Koch A, Treppendahl SP, Hansen JB. 6-Chloro-3-alkylamino-4H-thieno[3,2-e]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxide derivatives potently and selectively activate ATP sensitive potassium channels of pancreatic beta-cells. *J Med Chem* 2002 September 12;45(19):4171-87.
149. Nishida M, MacKinnon R. Structural basis of inward rectification: cytoplasmic pore of the G protein-gated inward rectifier GIRK1 at 1.8 Å resolution. *Cell* 2002 December 27;111(7):957-65.
150. Noma A. ATP-regulated K⁺ channels in cardiac muscle. *Nature* 1983 September 8;305(5930):147-8.
151. Pegan S, Arrabit C, Zhou W, Kwiatkowski W, Collins A, Slesinger PA, Choe S. Cytoplasmic domain structures of Kir2.1 and Kir3.1 show sites for modulating gating and rectification. *Nat Neurosci* 2005 March;8(3):279-87.
152. Proks P, Reimann F, Green N, Gribble F, Ashcroft F. Sulfonylurea stimulation of insulin secretion. *Diabetes* 2002 December;51 Suppl 3:S368-S376.
153. Quast U. ATP-sensitive K⁺ channels in the kidney. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1996 August;354(3):213-25.
154. Quast U, Baumlin Y, Loffler C. Ba²⁺ differentially inhibits the Rb⁺ efflux promoting and the vasorelaxant effects of levcromakalim and minoxidil sulfate in rat isolated aorta. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1995 December;353(1):86-93.
155. Quast U, Cook NS. Moving together: K⁺ channel openers and ATP-sensitive K⁺ channels. *Trends Pharmacol Sci* 1989 November;10(11):431-5.

156. Quast U, Stephan D, Bieger S, Russ U. The impact of ATP-sensitive K⁺ channel subtype selectivity of insulin secretagogues for the coronary vasculature and the myocardium. *Diabetes* 2004 December;53 Suppl 3:S156-S164.
157. Quayle JM, Nelson MT, Standen NB. ATP-sensitive and inwardly rectifying potassium channels in smooth muscle. *Physiol Rev* 1997 October;77(4):1165-232.
158. Quinn KV, Giblin JP, Tinker A. Multisite phosphorylation mechanism for protein kinase A activation of the smooth muscle ATP-sensitive K⁺ channel. *Circ Res* 2004 May 28;94(10):1359-66.
159. Rainbow RD, James M, Hudman D, Al JM, Singh H, Watson PJ, Ashmole I, Davies NW, Lodwick D, Norman RI. Proximal C-terminal domain of sulphonylurea receptor 2A interacts with pore-forming Kir6 subunits in KATP channels. *Biochem J* 2004 April 1;379(Pt 1):173-81.
160. Reimann F, Dabrowski M, Jones P, Gribble FM, Ashcroft FM. Analysis of the differential modulation of sulphonylurea block of beta-cell and cardiac ATP-sensitive K⁺ (K(ATP)) channels by Mg-nucleotides. *J Physiol* 2003 February 15;547(Pt 1):159-68.
161. Reimann F, Proks P, Ashcroft FM. Effects of mitiglinide (S 21403) on Kir6.2/SUR1, Kir6.2/SUR2A and Kir6.2/SUR2B types of ATP-sensitive potassium channel. *Br J Pharmacol* 2001 April;132(7):1542-8.
162. Reimann F, Tucker SJ, Proks P, Ashcroft FM. Involvement of the n-terminus of Kir6.2 in coupling to the sulphonylurea receptor. *J Physiol* 1999 July 15;518 (Pt 2):325-36.
163. Reyes CL, Chang G. Structure of the ABC transporter MsbA in complex with ADP.vanadate and lipopolysaccharide. *Science* 2005 May 13;308(5724):1028-31.
164. Rosenberg MF, Kamis AB, Aleksandrov LA, Ford RC, Riordan JR. Purification and crystallization of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). *J Biol Chem* 2004 September 10;279(37):39051-7.
165. Rosenberg MF, Kamis AB, Callaghan R, Higgins CF, Ford RC. Three-dimensional structures of the mammalian multidrug resistance P-glycoprotein demonstrate major conformational changes in the transmembrane domains upon nucleotide binding. *J Biol Chem* 2003 March 7;278(10):8294-9.
166. Rufer C, Losert W. Blood glucose lowering sulfonamides with asymmetric carbon atoms. 3. Related N-substituted carbamoylbenzoic acids. *J Med Chem* 1979 June;22(6):750-2.

167. Russ U, Hambrock A, Artunc F, Loffler-Walz C, Horio Y, Kurachi Y, Quast U. Coexpression with the inward rectifier K(+) channel Kir6.1 increases the affinity of the vascular sulfonylurea receptor SUR2B for glibenclamide. *Mol Pharmacol* 1999 November;56(5):955-61.
168. Russ U, Kuhner P, Prager R, Stephan D, Bryan J, Quast U. Incomplete dissociation of glibenclamide from wild-type and mutant pancreatic K ATP channels limits their recovery from inhibition. *Br J Pharmacol* 2009 January;156(2):354-61.
169. Sakura H, Ammala C, Smith PA, Gribble FM, Ashcroft FM. Cloning and functional expression of the cDNA encoding a novel ATP-sensitive potassium channel subunit expressed in pancreatic beta-cells, brain, heart and skeletal muscle. *FEBS Lett* 1995 December 27;377(3):338-44.
170. Salkoff L, Jegla T. Surfing the DNA databases for K+ channels nets yet more diversity. *Neuron* 1995 September;15(3):489-92.
171. Samaha FF, Heineman FW, Ince C, Fleming J, Balaban RS. ATP-sensitive potassium channel is essential to maintain basal coronary vascular tone in vivo. *Am J Physiol* 1992 May;262(5 Pt 1):C1220-C1227.
172. Sanchez JA, Gono T, Inagaki N, Katada T, Seino S. Modulation of reconstituted ATP-sensitive K(+)-channels by GTP-binding proteins in a mammalian cell line. *J Physiol* 1998 March 1;507 (Pt 2):315-24.
173. Sausbier M, Arntz C, Bucurenciu I, Zhao H, Zhou XB, Sausbier U, Feil S, Kamm S, Essin K, Sailer CA, Abdullah U, Krippeit-Drews P, Feil R, Hofmann F, Knaus HG, Kenyon C, Shipston MJ, Storm JF, Neuhuber W, Korth M, Schubert R, Gollasch M, Ruth P. Elevated blood pressure linked to primary hyperaldosteronism and impaired vasodilation in BK channel-deficient mice. *Circulation* 2005 July 5;112(1):60-8.
174. Sausbier M, Hu H, Arntz C, Feil S, Kamm S, Adelsberger H, Sausbier U, Sailer CA, Feil R, Hofmann F, Korth M, Shipston MJ, Knaus HG, Wolfer DP, Pedroarena CM, Storm JF, Ruth P. Cerebellar ataxia and Purkinje cell dysfunction caused by Ca²⁺-activated K⁺ channel deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004 June 22;101(25):9474-8.
175. Schnitzler M, Derst C, Daut J, Preisig-Muller R. ATP-sensitive potassium channels in capillaries isolated from guinea-pig heart. *J Physiol* 2000 June 1;525 Pt 2:307-17.
176. Schreiber M, Yuan A, Salkoff L. Transplantable sites confer calcium sensitivity to BK channels. *Nat Neurosci* 1999 May;2(5):416-21.

177. Schulze D, Rapedius M, Krauter T, Baukrowitz T. Long-chain acyl-CoA esters and phosphatidylinositol phosphates modulate ATP inhibition of KATP channels by the same mechanism. *J Physiol* 2003 October 15;552(Pt 2):357-67.
178. Schwanstecher M, Brandt C, Behrends S, Schaupp U, Panten U. Effect of MgATP on pinacidil-induced displacement of glibenclamide from the sulphonylurea receptor in a pancreatic beta-cell line and rat cerebral cortex. *Br J Pharmacol* 1992 June;106(2):295-301.
179. Schwanstecher M, Sieverding C, Dorschner H, Gross I, Aguilar-Bryan L, Schwanstecher C, Bryan J. Potassium channel openers require ATP to bind to and act through sulfonylurea receptors. *EMBO J* 1998 October 1;17(19):5529-35.
180. Seino S. ATP-sensitive potassium channels: a model of heteromultimeric potassium channel/receptor assemblies. *Annu Rev Physiol* 1999;61:337-62.
181. Seino S, Miki T. Physiological and pathophysiological roles of ATP-sensitive K⁺ channels. *Prog Biophys Mol Biol* 2003 February;81(2):133-76.
182. Sharma N, Crane A, Clement JP, Gonzalez G, Babenko AP, Bryan J, Aguilar-Bryan L. The C terminus of SUR1 is required for trafficking of KATP channels. *J Biol Chem* 1999 July 16;274(29):20628-32.
183. Shyng SL, Nichols CG. Membrane phospholipid control of nucleotide sensitivity of KATP channels. *Science* 1998 November 6;282(5391):1138-41.
184. Simpson SH, Majumdar SR, Tsuyuki RT, Eurich DT, Johnson JA. Dose-response relation between sulfonylurea drugs and mortality in type 2 diabetes mellitus: a population-based cohort study. *CMAJ* 2006 January 17;174(2):169-74.
185. Smith PC, Karpowich N, Millen L, Moody JE, Rosen J, Thomas PJ, Hunt JF. ATP binding to the motor domain from an ABC transporter drives formation of a nucleotide sandwich dimer. *Mol Cell* 2002 July;10(1):139-49.
186. Spruce AE, Standen NB, Stanfield PR. Voltage-dependent ATP-sensitive potassium channels of skeletal muscle membrane. *Nature* 1985 August 22;316(6030):736-8.
187. Standen NB, Quayle JM, Davies NW, Brayden JE, Huang Y, Nelson MT. Hyperpolarizing vasodilators activate ATP-sensitive K⁺ channels in arterial smooth muscle. *Science* 1989 July 14;245(4914):177-80.
188. Stephan D, Stauss E, Lange U, Felsch H, Löffler-Walz C, Hambrock A, Russ U, Quast U. The mutation Y1206S increases the affinity of the sulphonylurea receptor SUR2A for glibenclamide and enhances the effects of coexpression with Kir6.2. *Br J Pharmacol* 2005 April;144(8):1078-88.

189. Stephan D, Winkler M, Kuhner P, Russ U, Quast U. Selectivity of repaglinide and glibenclamide for the pancreatic over the cardiovascular K(ATP) channels. *Diabetologia* 2006 September;49(9):2039-48.
190. Stevens RJ, Coleman RL, Adler AI, Stratton IM, Matthews DR, Holman RR. Risk factors for myocardial infarction case fatality and stroke case fatality in type 2 diabetes: UKPDS 66. *Diabetes Care* 2004 January;27(1):201-7.
191. Storm JF. Potassium currents in hippocampal pyramidal cells. *Prog Brain Res* 1990;83:161-87.
192. Suzuki M, Fujikura K, Inagaki N, Seino S, Takata K. Localization of the ATP-sensitive K⁺ channel subunit Kir6.2 in mouse pancreas. *Diabetes* 1997 September;46(9):1440-4.
193. Suzuki M, Kotake K, Fujikura K, Inagaki N, Suzuki T, Gono T, Seino S, Takata K. Kir6.1: a possible subunit of ATP-sensitive K⁺ channels in mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun* 1997 December 29;241(3):693-7.
194. Tanabe K, Tucker SJ, Ashcroft FM, Proks P, Kioka N, Amachi T, Ueda K. Direct photoaffinity labeling of Kir6.2 by [γ -(32)P]ATP-[γ]4-azidoanilide. *Biochem Biophys Res Commun* 2000 June 7;272(2):316-9.
195. Tanabe K, Tucker SJ, Matsuo M, Proks P, Ashcroft FM, Seino S, Amachi T, Ueda K. Direct photoaffinity labeling of the Kir6.2 subunit of the ATP-sensitive K⁺ channel by 8-azido-ATP. *J Biol Chem* 1999 February 12;274(7):3931-3.
196. Thorneloe KS, Maruyama Y, Malcolm AT, Light PE, Walsh MP, Cole WC. Protein kinase C modulation of recombinant ATP-sensitive K(+) channels composed of Kir6.1 and/or Kir6.2 expressed with SUR2B. *J Physiol* 2002 May 15;541(Pt 1):65-80.
197. Trapp S, Haider S, Jones P, Sansom MS, Ashcroft FM. Identification of residues contributing to the ATP binding site of Kir6.2. *EMBO J* 2003 June 16;22(12):2903-12.
198. Tucker SJ, Ashcroft FM. Mapping of the physical interaction between the intracellular domains of an inwardly rectifying potassium channel, Kir6.2. *J Biol Chem* 1999 November 19;274(47):33393-7.
199. Tucker SJ, Baukrowitz T. How highly charged anionic lipids bind and regulate ion channels. *J Gen Physiol* 2008 May;131(5):431-8.
200. Tucker SJ, Gribble FM, Zhao C, Trapp S, Ashcroft FM. Truncation of Kir6.2 produces ATP-sensitive K⁺ channels in the absence of the sulphonylurea receptor. *Nature* 1997 May 8;387(6629):179-83.

201. Tusnady GE, Bakos E, Varadi A, Sarkadi B. Membrane topology distinguishes a subfamily of the ATP-binding cassette (ABC) transporters. *FEBS Lett* 1997 January 27;402(1):1-3.
202. Ueda K, Inagaki N, Seino S. MgADP antagonism to Mg²⁺-independent ATP binding of the sulfonylurea receptor SUR1. *J Biol Chem* 1997 September 12;272(37):22983-6.
203. Ueda K, Komine J, Matsuo M, Seino S, Amachi T. Cooperative binding of ATP and MgADP in the sulfonylurea receptor is modulated by glibenclamide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999 February 16;96(4):1268-72.
204. Verdon G, Albers SV, Dijkstra BW, Driessen AJ, Thunnissen AM. Crystal structures of the ATPase subunit of the glucose ABC transporter from *Sulfolobus solfataricus*: nucleotide-free and nucleotide-bound conformations. *J Mol Biol* 2003 July 4;330(2):343-58.
205. Vila-Carriles WH, Zhao G, Bryan J. Defining a binding pocket for sulfonylureas in ATP-sensitive potassium channels. *FASEB J* 2007 January;21(1):18-25.
206. Wakatsuki T, Nakaya Y, Miyoshi Y, Zeng XR, Nomura M, Saito K, Inoue I. Effects of vasopressin on ATP-sensitive and Ca²⁺-activated K⁺ channels of coronary arterial smooth muscle cells. *Jpn J Pharmacol* 1992;58 Suppl 2:339P.
207. Walker JE, Saraste M, Runswick MJ, Gay NJ. Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J* 1982;1(8):945-51.
208. Winkler M, Stephan D, Bieger S, Kuhner P, Wolff F, Quast U. Testing the bipartite model of the sulfonylurea receptor binding site: binding of A-, B-, and A + B-site ligands. *J Pharmacol Exp Ther* 2007 August;322(2):701-8.
209. Yatani A, Birnbaumer L, Brown AM. Direct coupling of the somatostatin receptor to potassium channels by a G protein. *Metabolism* 1990 September;39(9 Suppl 2):91-5.
210. Yuan YR, Blecker S, Martsinkevich O, Millen L, Thomas PJ, Hunt JF. The crystal structure of the MJ0796 ATP-binding cassette. Implications for the structural consequences of ATP hydrolysis in the active site of an ABC transporter. *J Biol Chem* 2001 August 24;276(34):32313-21.
211. Zerangue N, Schwappach B, Jan YN, Jan LY. A new ER trafficking signal regulates the subunit stoichiometry of plasma membrane K(ATP) channels. *Neuron* 1999 March;22(3):537-48.

-
212. Zingman LV, Alekseev AE, Bienengraeber M, Hodgson D, Karger AB, Dzeja PP, Terzic A. Signaling in channel/enzyme multimers: ATPase transitions in SUR module gate ATP-sensitive K⁺ conductance. *Neuron* 2001 August 2;31(2):233-45.
213. Zingman LV, Hodgson DM, Bast PH, Kane GC, Perez-Terzic C, Gumina RJ, Pucar D, Bienengraeber M, Dzeja PP, Miki T, Seino S, Alekseev AE, Terzic A. Kir6.2 is required for adaptation to stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002 October 1;99(20):13278-83.
214. Zunkler BJ, Lins S, Ohno-Shosaku T, Trube G, Panten U. Cytosolic ADP enhances the sensitivity to tolbutamide of ATP-dependent K⁺ channels from pancreatic B-cells. *FEBS Lett* 1988 November 7;239(2):241-4.

7 VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN

ABC-Protein	„ATP Binding Cassette“-Protein
ADP	Adenosindiphosphat
AP	Aktionspotential
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
Aqua demin.	demineralisiertes Wasser
ATP	Adenosintri-phosphat
AZ-DF265	4-[[N-(α -phenyl-2-piperidino-benzyl)carbamoyl]methyl]
BIR	„ β -cell inward rectifier“
B_{max}	maximale Bindungskapazität
B_s	spezifische Bindung
B_{tot}	totale Bindung
BtuCD	ABC-Transporter, der bei der Vitamin B12 Aufnahme beteiligt ist
Ca^{2+}	Calcium-Ion
cAMP	zyklisches AMP (Adenosinmonophosphat)
Ci	Curie, Einheit der spezifischen Aktivität eines radioaktiven Stoffes
CFTR	„Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator“
Cl^-	Chlorid-Ion
CL3	„cytosolic loop 3“
CL8	„cytosolic loop 8“
cpm	„counts per minute“, Impulse pro Minute
d	Distanz zur Identitätslinie
dpm	„decays per minute“, Zerfälle pro Minute

ER	Endoplasmatisches Reticulum
<i>g</i>	Gravitationsbeschleunigung (9.81 m/s ²)
GBC	Glibenclamid
GK	Glukokinase
GLUT	Glukosetransporter
³ H	Radioisotop Tritium
HEK-293-Zellen	menschliche embryonale Nierenzelllinie (Human Embryonal Kidney cells)
IC ₅₀	halbmaximale Inhibitionskonzentration
K ⁺	Kalium-Ion
K _{2P}	Tandemkaliumkanal
K _{ATP}	ATP empfindlicher Kaliumkanal
kb	Kilobasenpaare
K _{Ca}	Ca ²⁺ -abhängiger Kaliumkanal
kDA	Kilodalton
K _D	Gleichgewichtsdissoziationskonstante
K _I	Gleichgewichtsdissoziationskonstante des Inhibitors
K _{IR} /Kir	einwärtsgleichrichtender Kaliumkanal („inwardly rectifying K ⁺ channel“)
K _V	spannungsabhängiger Kaliumkanal
L0	„cytoplasmatic loop“
M	Transmembranhelix
M	Molarität (mol/l)
Mg ²⁺	Magnesium-Ion

MgADP	Magnesiumadenosindiphosphat
MgATP	Magnesiumadenosintriphosphat
ml	Milliliter
mmol	Millimol
MRP	„multidrug resistance-associated protein“
Msba	„Lipid A export ATP-binding/permease protein“
mV	Millivolt
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromol
n	Anzahl der Einzelversuche
n _H	Hill-Koeffizient
Na ⁺	Natrium-Ion
NBF	Nukleotidbindungsfalte
nm	Nanometer
nM	Nanomol
NO	Stickstoffmonoxid
NSB	nichtspezifische Bindung
P1075	N-cyano-N'-(1,1-dimethylpropyl)-N''-3-pyridylguanidine
PIP ₂	Phosphatidylinositolbisphosphat
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PMT	„Photo-multiplier-tubes“
pS	Picosiemens
RKR	ER-Retentionsmotiv
SEM	„standard error of the mean“, Standardabweichung des Mittelwertes
SUR	Sulfonylharnstoffrezeptor

TM	Transmembranuntereinheit/-helix
TMD	Transmembrandomäne
UL-DF9	„4-[2-(3,4-dihydro-7-methoxy-4,4-dimethyl-1,3-dioxo-2(1H)-isoquinolyl)-ethyl]benzoic acid“

8 DANKSAGUNG

Mein Dank gilt all jenen, die mich bei der Anfertigung des praktischen sowie des schriftlichen Teils dieser Arbeit unterstützt haben.

Besonders möchte ich mich bei Prof. U. Quast bedanken, der nicht nur für eine gute Betreuung während meiner praktischen Tätigkeit gesorgt hat, sondern auch immer ein offenes Ohr hatte und Zeit fand beim Anfertigen des schriftlichen Manuskripts.

Des Weiteren möchte ich mich persönlich bei M. Winkler, Dr. D. Stephan, P. Kühner und Dr. U. Ruß für die Arbeit im Labor und deren tatkräftige Unterstützung bedanken.

Diese Arbeit wäre ohne den Rückhalt meiner Familie, insbesondere meiner Frau, und meiner Freunde (v.a. Olaf) nicht möglich gewesen, so dass auch diesen mein aufrichtiger Dank gilt.

Mein Glaube an Gott hat mich diese Zeit über getragen und mir Stärke gegeben.

9 LEBENS LAUF

Felix Wolff, geboren am 14.11.1977 in München

1984 - 1988	Grundschule in Dettum
1988 - 1990	Orientierungsstufe Sickte
1990 - 1997	Gymnasium im Schloß Wolfenbüttel
Juni 1997	Allgemeine Hochschulreife
1998 - 1999	Zivildienst Städt. Krankenhaus Wolfenbüttel
April 1999	Medizinstudium Philipps-Universität Marburg
2001	Ärztliche Vorprüfung
2002	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2002 - 2003	Auslandsstudium in Frankreich (Poitiers)
Oktober 2003	Medizinstudium an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
2005	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2005 - 2006	Praktisches Jahr im Städt. Krankenhaus Friedrichshafen
23. Mai 2006	3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Januar 2007	Assistenzarzt in der Unfallchirurgie Hanse-Klinikum Wismar